

Agendia NV.

Sada MammaPrint® a BluePrint® pro recidivu rakoviny prsu a molekulární subtypování & software ADAPT – návod k použití

*Cílené sekvenování RNA z tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých
v parafínu (FFPE) k posouzení rizika recidivy rakoviny prsu a molekulárního
subtypu*

Obsah

Zamýšlené použití/Účel.....	3
Shrnutí a vysvětlení testu.....	4
Co je měřeno a zjišťováno.....	4
Princip procedury.....	4
Činidla	5
Poskytnutá činidla	5
Potřebná činidla a vybavení nejsou obsažena	6
Upozornění a bezpečnostní opatření.....	8
Skladování a manipulace.....	9
Odběr vzorků a příprava na analýzu	11
Kontrola kvality	12
Analytické hodnocení kvality	12
Kontrola kvality 1: Hodnocení kvality celkové purifikované FFPE RNA	12
Kontrola kvality 2: Hodnocení kvality knihoven cDNA ligovaných adaptérem (adaptor-ligated cDNA libraries)	12
Kontrola kvality 3: Hodnocení kvality amplifikovaných, cílově obohacených, indexovaných knihoven	12
Kontroly testu	12
Testovací postup	13
Krok 1: Hodnocení kvality FFPE RNA a příprava.....	14
Krok 2: Příprava knihovny Agendia NGS	14
Krok 3: Cílové obohacení Agendia NGS Target Enrichment.....	19
Kontrola kvality 3: Hodnocení kvality amplifikovaných, cílově obohacených, indexovaných knihoven	25
Krok 4: Nahrávání Agendia NGS MiSeq Loading	26
Krok 5: Analýza souborů FASTQ prostřednictvím nástroje ADAPT	29
Výsledky	30
Interpretace výsledků	30
MammaPrint	30

BluePrint	31
Omezení u procedury.....	31
Očekávané hodnoty	32
MammaPrint	32
BluePrint	32
Funkční vlastnosti	33
MammaPrint	33
BluePrint	34
Asistence	36
Datum vydání	36
Upozornění:	36
Reference	39
Příloha A: Nukleotidové sekvence indexů MammaPrint BluePrint NGS 8bp.....	42

Vhodné pro

Pro odborné laboratorní použití.

Před rutinním prováděním testu podstoupí laboratoře školicí a úvodní program společnosti Agendia. Po úspěšném absolvování bude laboratoři vystaven certifikát.

PŘED POUŽITÍM SI PEČLIVĚ PŘEČTĚTE VŠECHNY INSTRUKCE.

Zamýšlené použití/Účel

Sada MammaPrint BluePrint pro recidivu rakoviny prsu a molekulární subtypování je kvalitativní, neautomatizovaný diagnostický test „in vitro“ určený k použití v klinických laboratořích. Využívá sekvenování nové generace (NGS) s cílovým obohacením pro hodnocení genové exprese na vzorcích tkáně rakoviny prsu, zalitých ve formalínu fixovaném v parafínu (FFPE) k posouzení pacientova rizika pro vzdálené metastázy a určení molekulárního subtypu. Toto zařízení je určeno pouze pro profesionální použití.

70Genový test MammaPrint je určen k rozlišení pacientek s nízkým, či vysokým rizikem rozvoje vzdálených metastáz do 5 let od diagnózy [1] [2] [3]. 80Genový test BluePrint je určen k posouzení molekulárního subtypu rakoviny prsu a také určuje, zda jde o nádory typu Luminal, HER2 nebo Basal [4].

Sada MammaPrint and Blueprint Kit se používá u pacientek s rakovinou prsu v prvním, nebo druhém stádiu onemocnění, které mají negativní lymfatické uzliny, nebo až 3 pozitivní lymfatické uzliny, s nádorem menším nebo rovným 5,0 cm, a také pro pacientky ve třetím stádiu onemocnění. Výsledek MammaPrint je určen pro lékařské použití jako prognostický marker pouze společně s dalšími klinicko-patologickými faktory. [5]. Test MammaPrint BluePrint Kit se provádí na sekvenovacím systému Illumina® MiSeq® Sequencer System a výsledky se analyzují pomocí nástroje ADAPT (Agendia Data Analysis Pipeline Tool).

Shrnutí a vysvětlení testu

Co je měřeno a zjišťováno

Test MammaPrint Blueprint Kit poskytuje individualizovaný výsledek pro ‚Nízké riziko‘, nebo ‚Vysoké riziko‘ recidivy onemocnění a zároveň také individuální určení molekulárního subtypu nádoru.

MammaPrint určuje aktivitu 70 genů ve vzorku nádoru, což vede k expresnímu profilu, neboli „otisku prstu“ nádoru. Pomocí proprietárního algoritmu se profil genové exprese používá k výpočtu takzvaného MammaPrint Indexu (MPI), který udává prognostický profil rizika recidivy rakoviny prsu.

Blueprint určuje aktivitu 80 genů ve vzorku nádoru, což vede ke třem profilům exprese. Pomocí proprietárního algoritmu se tyto tři profily genové exprese použijí k výpočtu indexů Blueprint, které jsou pak používány k určení molekulárního subtypu vzorku: Buď typ Luminal, HER2 nebo Basal. Geny a skórovací algoritmy používané u sady MammaPrint Blueprint Kit jsou identické s těmi, které se používají pro test MammaPrint a Blueprint prováděný v diagnostické laboratoři společnosti Agendia (Agendia's Diagnostic Service Laboratory), na DNA čípech ([1] [2] [3] [6] [7] [8]).

Princip procedury

MammaPrint Blueprint Kit je neautomatizovaný laboratorní proces, který využívá zachycení sekvenování k určení genové exprese v RNA izolované z tkáně FFPE s obsahem nádorových buněk alespoň 30 %.

Souprava umožňuje přípravu cílených knihoven NGS z FFPE RNA pomocí cílově obohaceného systému Agilent SureSelect^{XT} RNA, bez kroku ribozomální deplece. Pracovní postup cílového obohacování využívá ultra dlouhé 120merové biotinylované cRNA návody k zachycení genů MammaPrint a Blueprint, které obohatí z knihovny genomových fragmentů NGS. Údaje o počtu čtení (read count data), generované z výstupu sekvenování (ve formátu FASTQ), se používají k posouzení expresních úrovní profilů MammaPrint a Blueprint a k vykazání výsledků testů.

Výstup sekvenování je bezpečně přenesen na webový portál Agendia a analýza se provádí pomocí nástroje ADAPT (Agendia Data Analysis Pipeline Tool). Výsledek testu MammaPrint zahrnuje index MPI, který se uvádí na stupnici od -1 000 do +1 000 a určuje prognostický profil vzorku: Nízké riziko (MPI větší než +0,000) nebo vysoké riziko (MPI rovno nebo menší než 0,000). Výsledky testu Blueprint zahrnují tři indexy Blueprint, z nichž ten nejvyšší určuje molekulární subtyp vzorku.

Činidla

Poskytnutá činidla

Katalog #931280 byl nakonfigurován až pro 16 reakcí.

Příprava NGS RNA knihovny MammaPrint Blueprint (Pre-PCR) Katalogové číslo #931281 [Krabice 1 ze 4]		-15 °C až -25 °C
Komponent	Kat. #	Objem
Fragmentační mix Agendia NGS	931281-01	304 µL
Master mix Agendia NGS prvního	931281-02	140 µL
Mix Agendia NGS druhého vlákna (Agendia NGS 2nd Strand) + Mix	931281-03	400 µL
Mix Agendia NGS druhého vlákna (Agendia NGS 2nd Strand) + Mix	931281-04	80 µL
Agendia NGS dA Tailing Master Mix	931281-05	320 µL
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	931281-06	80 µL
Agendia NGS Ligation Master Mix	931281-07	80 µL
Agendia NGS Forward PCR Primer	931281-08	60 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Agendia NGS Uracil DNA glykosyláza	931281-10	16 µL
Agendia NGS Reverse PCR Primer	931281-11	16 µL
Agendia NGS voda bez nukleázy	931282-07	2,4 mL

Cílové obohacování MammaPrint Blueprint Target Enrichment NGS (Post- PCR Box 2) Katalogové číslo #931283 [Krabice 3 ze 4]		-15 °C až -25 °C
Komponent	Kat. #	Objem
Indexovací blok Agendia NGS 1	931283-01	45 µL
Agendia NGS Blok 2	931283-02	45 µL
Indexovací blok Agendia NGS 3	931283-03	12 µL
Agendia NGS RNase Blok	931283-04	18 µL
Agendia NGS Hyb 3	931283-05	160 µL
Agendia NGS Post-Capture PCR primer	931283-06	16 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Indexový štítek Agendia NGS 8bp*	931283-07	12 µL

Cílové obohacování MammaPrint Blueprint NGS Target Enrichment (Post-PCR Box 1) Katalogové číslo #931282 [Krabice 2 ze 4]		15 °C až 30 °C
Komponent	Kat. #	Objem
Agendia NGS Hyb 1	931282-01	400 µL
Agendia NGS Hyb 2	931282-02	1,25 mL
Agendia NGS Hyb 4	931282-03	1,25 mL
Pufr Agendia NGS Binding Buffer	931282-04	13,2 mL
Pufr Agendia NGS Wash Buffer 1	931282-05	8 mL
Pufr Agendia NGS Wash Buffer 2	931282-06	24 mL
Agendia NGS voda bez nukleázy	931282-07	2,4 mL
Pufr Agendia NGS Elution Buffer	931282-08	5,8 mL
Neutralizační pufr Agendia NGS Neutralization Buffer	931282-09	960 µL
Příbalový leták MammaPrint Blueprint	931282-10	1x

Panel MammaPrint Blueprint NGS Katalogové číslo #931284 [Krabice 4 ze 4]		-75 °C až -85 °C
Komponent	Kat. #	Objem
Knihovna návnad MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	931284	36 µL

* Indexové sekvence lze nalézt v [Příloha A: Nukleotidové sekvence indexů MammaPrint Blueprint NGS](#)


Potřebná činidla a vybavení nejsou obsažena

Činidlo	Výrobce, katalogové číslo
Sada pro izolaci RNA RNeasy FFPE	QIAGEN, 73504
Aktinomycin D	Ze Streptomyces sp. (Sigma-Aldrich, A1410)
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Invitrogen, 65601 nebo 65602
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter Genomics, A63880 nebo A63881 nebo A63882
Sada MiSeq Reagent Kit v3 Kit (150 cyklů)	Illumina, MS-102-3001
Sada PhiX Control Kit V3	Illumina, FC-110-3001
Dimethylsulfoxid	Na úrovni použití v molekulární biologii (Sigma-Aldrich, D8418)
Buffer EB	QIAGEN, 19086
Ethanol (EtOH), 100%	Na úrovni použití v molekulární biologii (VWR, 1085430250)
Tween 20	Neiontové (Sigma-Aldrich, P7949)
Voda bez nukleázy	Bez nukleázy, deionizovaná, bez chemických přísad (QIAGEN,
Hydroxid sodný (NaOH)	1N, Na úrovni použití v molekulární biologii (Sigma-Aldrich, 72068)
Xylen	Jakýkoli dostupný
Histo-Clear	Národní diagnostika, HS-200

Vybavení	Minimální specifikace
Platforma pro analýzu nukleových kyselin a spotřební materiály	RNA DV200 200 nt-4000 nt DNA 150 bp-550 bp (kvantitativní citlivost 0,5-50 ng/μL) DNA 150 bp-700 bp (kvantitativní citlivost 5-500 pg/μL)
Vortexový mixér	Jakýkoli dostupný
Odstředivka	Pro 1,5mL/0,5mL zkumavky
Desková odstředivka	Vhodné pro 0,8mL MIDI destičky
Vakuová odstředivka	Teplotní rozsah: 15 °C až 45 °C
Tepelné bloky	37 °C pro 0,8mL MIDI destičku 65 °C pro 1,5/2mL zkumavku
Tepelný mixér	27 °C a 65 °C 1200-1400 ot./min Vhodné pro 0,2mL zkumavky 8-strip tubes
Časovač	NIST sledovatelné
Magnetický stojan	Pojme 0,80mL destičky (Life Technologies, AM10027) Pojme zkumavky 8-strip tubes o velikosti 0,2 mL (Life Technologies, 12331D) Pojme 1,5/2mL zkumavky (Life Technologies, 12321D)
Termální cyklovač	Vyhřívané víko: 105 °C Teplotní rozsah: 4 °C-105 °C
Jednakanálové pipety	1 μL – 1000 μL
Zkumavky 8-strip tubes/míchadlo	Jakékoli dostupné
Vícekanálové pipety (volitelné)	1 μL – 1000 μL
Opakovací pipety (volitelné)	1 μL – 10 mL
Systém MiSeq	Illumina, SY-410-1003 nebo Illumina, DX-410-1001 mód RUO

*Poznámka: Činidla a obecné vybavení, uvedené výše, bylo schváleno společností Agendia pro použití v kombinaci se sadou MammaPrint Blueprint NGS. Tyto validace ukázaly, že kombinace těchto činidel a obecného vybavení a soupravy je bezpečná a funkční (viz část Funkční charakteristiky).

Upozornění a bezpečnostní opatření

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Toto zařízení je určeno pouze pro použití v profesionálních laboratořích, které jsou vyškolené a certifikované společností Agendia.
- Výsledky poskytované soupravou MammaPrint Blueprint pro recidivu rakoviny prsu a molekulární subtypování jsou určeny pro použití lékaři jako prognostický marker pouze v kombinaci se standardními klinicko-patologickými faktory. Test není vyroben k určení výsledku onemocnění, ani k navrhování nebo odvození individuální reakce pacienta na terapii.
- Používejte zařízení se vzorky tkáně ženského karcinomu prsu fixované ve formalínu a zalité v parafínu (FFPE).
- Obsah soupravy nepoužívejte po uplynutí doby expirace, vytištěné na vnější straně krabice.
- Nekombinujte komponenty testu ze souprav různých šarží. Šarže soupravy jsou uvedeny na štítku z vnější strany krabice.
- Komponenty soupravy skladujte při specifikovaných teplotách v určených před a poamplifikačních prostředích.
- K získání přesných výsledků je potřeba přesně dodržovat pokyny pro postup testu. Nedodržení pokynů, úprava návodu testovacího systému nebo použití činidel nebo nástrojů, popřípadě analytických nástrojů a nástrojů pro podávání zpráv, které nebyly společností Agendia doporučeny, může mít za následek neplatnost výsledků testu. Nedodržení pokynů pro deparafinizaci, izolaci RNA, cílové obohacení nebo sekvenování může mít za následek neplatnost výsledků testu.
- K získání validních výsledků je nutno, aby procento invazivních nádorových buněk bylo alespoň 30 %.
- Pro zajištění integrity vzorku jsou implementovány vhodné laboratorní procesy identifikace tkáně/vzorku.
- Neadekvátní nebo nekvalitní RNA může vést k nesprávným výsledkům.
- Pokud nemáte zkušenosti s izolací RNA nebo sekvenováním nové generace, vyhledejte konkrétní pokyny nebo školení.
- **POZNÁMKA:** Činidlo Agendia NGS Hyb 1 a pufr Agendia NGS Neutralization Buffer obsahují  potenciálně nebezpečné materiály, které mohou způsobit vážné podráždění očí a kůže. Vždy používejte ochranné rukavice, oděv, ochranu očí a obličeje. Po manipulaci s nimi si důkladně umyjte ruce. PŘI ZÁSAHU OČÍ: Oči opatrně vyplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud máte kontaktní čočky a jsou snadno vyjmutelné, vyjměte je. Poté pokračujte ve vyplachování.
- Používejte běžná laboratorní opatření. Nepipetujte ústy. Nejezte, nepijte a nekuřte ve vyhrazených prostorách laboratoře. Při manipulaci se vzorky a testovacími činidly používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a činidly testu si důkladně umyjte ruce.
- Aktinomycin D je dodáván jako pevná látka a připraví se v koncentraci 4 µg/µL v DMSO (Dimethylsulfoxid) a poté se skladuje v 3 µL jednorázových alikvotech při –20 °C, chráněných před světlem. Alikvoty mohou být před dalším použitím skladovány po dobu až jednoho roku. 4 µg/µL aktinomycinu D v DMSO se bezprostředně před použitím zředí vodou na konečnou koncentraci aktinomycinu D 120 ng/µL.



- POZNÁMKA: Aktinomycin D, použitý v druhém kroku postupu, je nebezpečný – akutní toxicita: orální, kožní a dýchací.

- Při práci v laboratoři používejte vhodné osobní ochranné pracovní prostředky (OOPP).



Skladování a manipulace

Obsah soupravy je stabilní až do data expirace, vytištěného na štítku na vnější straně krabice.

Každou krabici skladujte při následujících teplotách:

- Krabice 1 a krabice 3: mezi -15 °C a -25 °C
- Krabice 2: mezi 15 °C a 30 °C. Skladujte mimo přímé sluneční světlo.
- Krabice 4: mezi -75 °C a -85 °C

Zařízení lze použít maximálně pro 16 reakcí. Činidla jsou stabilní po maximálně 5 cyklů zmrazení/rozmrazení, ke kterým musí dojít před datem expirace, uvedeným na krabici.

Test musí být proveden v laboratoři při pokojové teplotě (mezi 15 °C a 25 °C).

Před použitím důkladně promíchejte na vortexu (vortexujte) a poté vizuálně zkontrolujte, že nejsou přítomny žádné sraženiny.

Ujistěte se, že připravujete denně čerstvý 0,2 N NaOH, který je stabilní až 12 hodin při skladování při pokojové teplotě.

Připravujte denně čerstvý 70% ethanol.

Při manipulaci s čistícími kuličkami PCR Clean-Up AMPure XP Beads a kuličkami Library Streptavidin Beads dodržujte následující doporučené postupy:

- Kuličky PCR Clean-Up AMPure XP Beads by nikdy neměly být zmrazeny.
- Před použitím nechte kuličky AMPure XP beads dosáhnout pokojové teploty, alespoň na dobu 30 minut
- Bezprostředně před použitím kuličky vortexujte, dokud nebudou dobře suspendovány a barva nebude homogenní
- Po přidání streptavidinových kuliček vzorek důkladně promíchejte pipetováním nahoru a dolů (10krát)
- Inkubujte směs kuliček/vzorků při pokojové teplotě po celou dobu, která je uvedena

Kontaminace PCR může způsobit nepřesné a nespolehlivé výsledky. Abyste předešli kontaminaci, zajistěte, aby oblasti před amplifikací a po amplifikaci měly vyhrazené specifické vybavení (např. pipety, špičky pipet, vortex a odstředivku).

Zabraňte křížové kontaminaci. Použijte čerstvé špičky pipet jak pro vzorky, tak pro dávkování činidel. Vzorky promíchejte pipetou a podle potřeby destičku odstředte. Destičky nevortexujte, pokud není uvedeno jinak. Použijte špičky odolné vůči aerosolu, abyste snížili riziko přenosu amplikonu a křížové kontaminace mezi vzorky.

Nakládání s odpadem

S použitými činidly zacházejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu s platnými regionálními, národními a lokálními zákony a předpisy. Informace o životním prostředí, zdraví a bezpečnosti naleznete v souborech s bezpečnostními daty (SDS) na adrese www.agendia.com/diagnostic-products.

Tento nástroj neobsahuje tkáň, buňky, ani látky zvířecího, lidského nebo mikrobiálního původu.

Odběr vzorků a příprava na analýzu

Manipulace s tkání před fixací musí být řízena protokolem odborné laboratoře.

Vyberte blok nádorové tkáně ženského karcinomu prsu FFPE pro každý vzorek, který má být zpracován, za použití vzorku tkáně, který obsahuje největší množství invazivního karcinomu a je morfologicky konzistentní s předloženou diagnózou. Vybraný nádorový blok FFPE by neměl být starší 5 let. Ujistěte se, že je vzorek během procesu identifikován jedinečným identifikátorem.

Skladování vzorku FFPE by mělo být prováděno podle protokolu profesionální laboratoře.

Následně by se pro každý tkáňový blok mělo nařezat 10 laboratorních sklíček o tloušťce 5 µm s jedním sériovým řezem 5 µm na každém sklíčku. Doporučuje se používat nabitá sklíčka, aby bylo sníženo riziko pádu řezů ze sklíčka. Jedno sklíčko bude použito pro barvení hematoxylinem a eosinem (H&E), což slouží k určení procenta nádorových buněk a zbývající sklíčka, v závislosti na velikosti tkáně, mohou být zcela nebo částečně použita pro izolaci RNA. Deparafinizaci je třeba provést pomocí Xylenu nebo Histo-Clear¹.

K získání validních výsledků je nutno, aby procento invazivních nádorových buněk bylo alespoň 30 %. Je-li to nutné a možné, lze provést makrodisekci, aby bylo předejito velkým oblastem karcinomu *in-situ*, nekrózy, tukové tkáně, stromatu a/nebo krvácení, jelikož ty snižují celkové procento invazivních nádorových buněk.

¹ Histo-Clear byl otestován pro použití se sadou MammaPrint Blueprint NGS.

Kontrola kvality

Proved'te příslušnou kalibraci a údržbu zařízení, používaného v laboratorních procesech, v souladu se standardními požadavky na kontrolu kvality vaší laboratoře.

Analytické hodnocení kvality

Kontrola kvality 1: Hodnocení kvality celkové purifikované FFPE RNA

Tato kontrola hodnotí kvalitu celkové FFPE RNA na základě metricky DV200.

DV200 se měří jako procento fragmentů RNA s délkou mezi 200 nt a 4000 nt.

Kontrola kvality 2: Hodnocení kvality knihoven cDNA ligovaných adaptérem (adaptor-ligated cDNA libraries)

Tato kontrola hodnotí kvalitu (fragmenty cDNA musí spadat do správného rozmezí velikosti, tj. mezi 150 až 550 bp) a kvantitu (ng/μL) knihovny cDNA ligované adaptérem.

Kontrola kvality 3: Hodnocení kvality amplifikovaných, cílově obohacených, indexovaných knihoven

Tato kontrola posuzuje kvalitu (fragmenty cDNA musí spadat do správného rozmezí velikosti, tj. mezi 150 až 700 bp), kvantitu (pg/μL) a molární koncentraci (pmol/L) amplifikované, cílově obohacené, indexované knihovny.

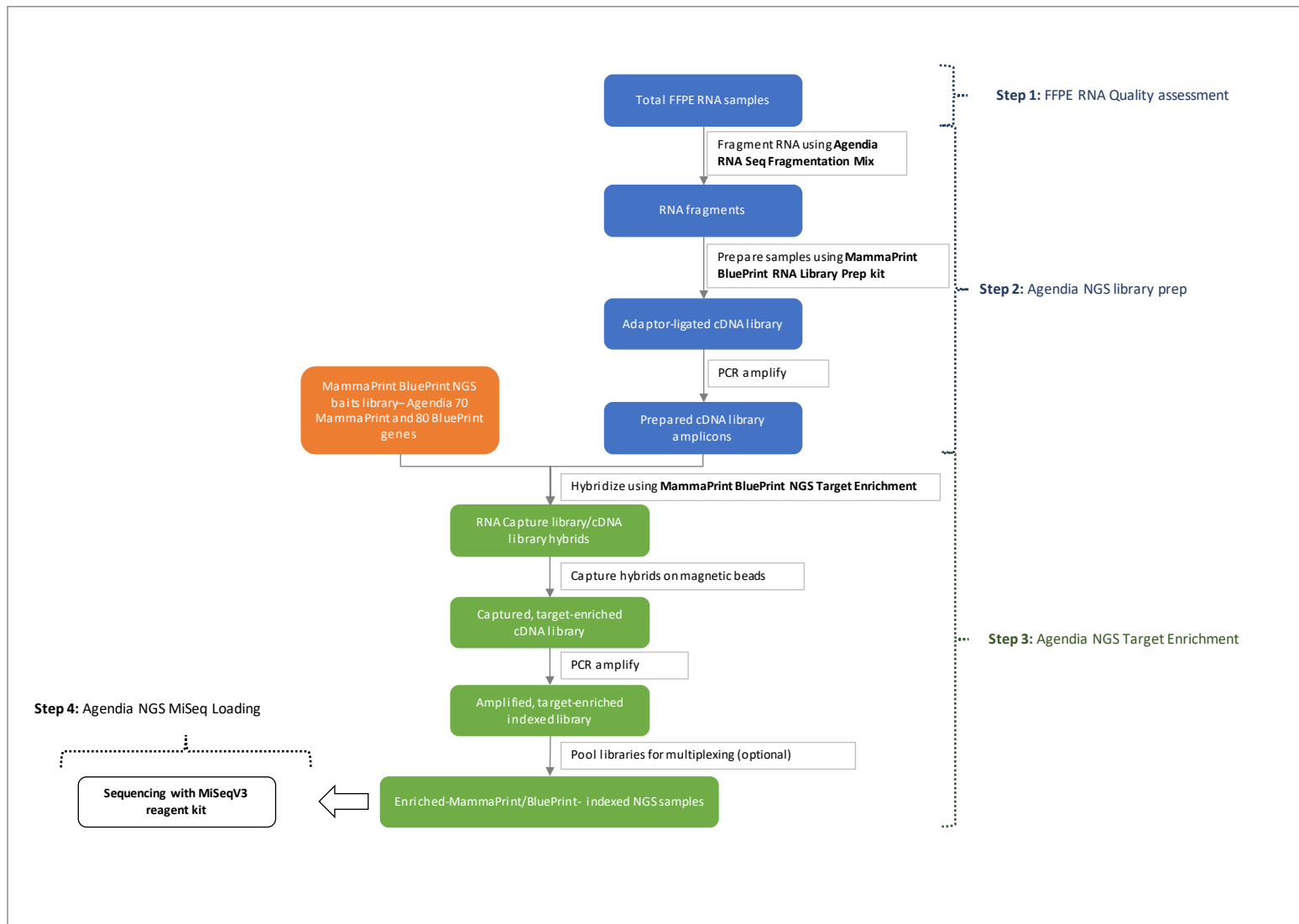
Kontroly testu

Správná laboratorní praxe doporučuje, že by měl být kontrolní materiál přezkoumán, aby byly zjištěny technické procedurální rozdíly v laboratoři uživatele, které mohou způsobit značnou variabilitu nebo nepřesnosti ve výsledcích.

Před prvním použitím tohoto testu v laboratoři uživatele se doporučuje ověřit správnost testu otestováním několika vzorků se známými výsledky.

Testovací postup

Obrázek 1 poskytuje přehled postupu.



Obrázek 1: Přehled procedury sady MammaPrint Blueprint Kit

Krok 1: Hodnocení kvality FFPE RNA a příprava

Izolace RNA se provádí pomocí sady QIAGEN RNeasy FFPE Kit v souladu s návodem k použití od výrobce. Izolovaná celková FFPE Total RNA musí mít hodnoty absorbančních poměrů 260/280 a 260/230 blízké 2,0 pro oba poměry. Poměry s významnou odchylkou od 2,0 mohou naznačovat přítomnost organických nebo anorganických kontaminantů, což může vést k potřebě dalšího čištění, nebo to může naznačovat, že vzorek není vhodný pro použití se sadou MammaPrint BluePrint Kit.

Než začnete, připravte celkovou RNA z každého vzorku ve vodě bez nukleázy.

Hodnocení kvality FFPE RNA			
1.1	Vyhodnoťte hodnotu DV200 pro vzorky FFPE RNA pomocí vhodné platformy pro analýzu fragmentů nukleové kyseliny.		
	Alikvotujte 200ng RNA z každého vzorku pro Standardní, Dobré až střední, a Slabé vzorky.		
	Pokud není k dispozici 200 ng, alikvotujte množství RNA uvedené v tabulce níže.		
	Kategorie	Distribuční hodnota (DV200)	Množství RNA požadované pro přípravu knihovny
	Standardní	≥70 % nad 200 nt	100 ng
	Dobré až střední	≥50% nad 200 nt	150 ng
	Slabý	≥20% nad 200 nt	200 ng
	Nedoporučeno	<20 % nad 200 nt	Nedoporučeno

Krok 2: Příprava knihovny Agendia NGS

Fragmentace RNA a žihání primerů	
2.1	Rozmrzte Agendia NGS Fragmentation Mix v pokojové teplotě a poté umístěte na led.
2.2	Rozmrzte Agendia NGS First Strand Master Mix na ledu.
2.3	K lyofilizaci alikvotního podílu FFPE RNA použijte vakuovou odstředivku (≤45 °C). <u>Pozor na přesušení.</u>
2.4	Vortexujte Agendia NGS Fragmentation Mix po dobu 10 sekund. Resuspendujte FFPE RNA v 19 µL Agendia NGS Fragmentation Mix . Vortexujte a krátce odstředte.
2.5	Pro vzorky Standardní a Dobré/střední kvality RNA použijte následující program tepelného cyklovače: Zahřejte víko na 95 °C. 1. 2 minuty při 94 °C 2. 3 minuty při 65 °C 3. Minimálně 1 minutu při 4 °C Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.
2.6	Pro vzorky s nízkou kvalitou RNA (Slabé vzorky) použijte následující program tepelného cyklovače: Zahřejte víko na 95 °C 1. 5 minut při 65 °C 2. Minimálně 1 minutu při 4 °C Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.

Syntéza prvního vlákna cDNA	
2.7	Připravte čerstvý 120 ng/µL Aktinomycin D roztok podle tabulky níže. Tento objem vystačí na 96 reakcí.

	Agendia NGS voda bez nukleázy	97 µL
	Aktinomycin D (4 µg/µL v DMSO)	3 µL
	<i>Celkový objem</i>	100 µL
	Vortexujte, krátce odstředte, udržujte při pokojové teplotě a chraňte před světlem.	
2.8	Připravte Agendia NGS First Strand Synthesis Mix podle tabulky níže. Vypočítejte pro 1 další reakci.	
	Poznámka: Před smícháním složek činidel vortexujte First Strand Master Mix po dobu 10 sekund.	
	Činidlo	Objem na reakci
	Aktinomycin D (120 ng/µL v H₂O)	0,5 µL
	Agendia NGS First Strand Master Mix	8,0 µL
	<i>Celkový objem</i>	8,5 µL
	Vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.	
2.9	Na ledu přidejte 8,5 µL Agendia NGS First Strand Synthesis Mix do každé jamky nové desky s prvním řetězcem cDNA (First Strand cDNA plate).	
2.10	Přeneste fragmentovanou FFPE RNA do jamek destičky s prvním řetězcem cDNA. Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.	
2.11	Použijte následující program tepelného cyklovače:	
	Zahřejte víko na 95 °C.	
	1. 10 minut při 25 °C	
	2. 40 minut při 37 °C	
	3. Minimálně 3 minuty při 4 °C	
	Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.	

Syntetizace druhého řetězce cDNA a Oprava konců		
2.12	Připravte Second Strand Synthesis and End Repair Mix podle tabulky níže. Vypočítejte pro 1 další reakci.	
	Poznámka: Před smícháním každé činidlo vortexujte po dobu 5 sekund.	
	Činidlo	Objem na reakci
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Enzyme Mix	25,0 µL
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Oligo Mix	5,0 µL
	<i>Celkový objem</i>	30,0 µL
	Vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.	
2.13	Přidejte 30 µL Second Strand Synthesis and End Repair Mix do každé jamky.	
2.14	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.	
2.15	Použijte následující program tepelného cyklovače:	
	Nepoužívejte vyhřáté víko. Pokud vyhřívání víka nelze deaktivovat, program by měl být spuštěn s otevřeným víkem.	
	1. 60 minut při 16 °C	
	2. Minimálně 3 minuty při 4 °C	
	Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.	

Purifikace syntetizované cDNA pomocí kuliček AMPure XP	
2.16	Nechte kuličky AMPure XP dosahovat pokojové teploty po dobu alespoň 30 minut. Vortexujte suspenzi kuliček, dokud není homogenní. Pokud postupujete k Adenylate cDNA 3'Ends , rozmrazte Agendia NGS dA Tailing Master Mix na ledu.
2.17	Přidejte 108 µL homogenní suspenze kuliček do každé jamky nové, 96jamkové MIDI destičky po 0,8 mL.
2.18	Přeneste 57,5 µL vzorkové směsi do příslušné 0,8mL jamky 96jamkové MIDI destičky.
2.19	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.
2.20	Vzorky inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
2.21	Umístěte destičku na magnetický stojan při pokojové teplotě alespoň na 5 minut.
2.22	S destičkou stále na magnetickém stojanu opatrně vyjměte a zlikvidujte vyčištěný roztok z každé jamky. Při odstraňování roztoku se nedotýkejte kuliček.
2.23	S destičkou stále na magnetickém stojanu nadávkujte do každé jamky 200 µL čerstvého 70% ethanolu.
2.24	Počkejte 10 sekund (nebo dokud nebude roztok čirý), aby se všechny kuličky usadily, a poté opatrně odstraňte ethanol.
2.25	Opakujte - celkem 2 mytí.
2.26	V případě potřeby MIDI destičku krátce odstředte, poté ji vraťte do magnetického stojanu a odstraňte zbývající kapičky ethanolu pomocí pipety.
2.27	Sušte vzorky na tepelném bloku při 37 °C po dobu 3 minut. Nepřesušte je, ale zároveň se ujistěte, že je veškerý ethanol odstraněn.
2.28	Do každé jamky na vzorek přidejte 21,5 µL vody bez nukleázy.
2.29	Destičku uzavřete, dobře vortexujte a krátce ji odstředte, aby se kapalina nashromáždila.
2.30	Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
2.31	Umístěte MIDI destičku na magnetický stojan a inkubujte po dobu 5 minut nebo dokud není roztok čirý.
2.32	Odeberte 20 µL vyčištěného precipitátu a přidejte jej do nové 96jamkové destičky o objemu jamky 0,2 mL.
Bod zastavení: Pokud nepokračujete dalším krokem, destičku uzavřete a skladujte ji při teplotě -15 °C až -20 °C.	

Adenylát cDNA 3'Ends									
2.33	Rozmrazte Agendia NGS dA Tailing Master Mix na ledu. Vortexujte Agendia NGS dA Tailing Master Mix ve vysoké rychlosti po dobu 15 sekund. Přidejte 20 µL do každé jamky v destičce, obsahující 20 µL vyčištěného precipitátu. Vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.								
2.34	Použijte následující program tepelného cyklovače: Nepoužívejte vyhřáté víko. Pokud vyhřívání víka nelze deaktivovat, program by měl být spuštěn s otevřeným víkem. 1. 30 minut při 37 °C 2. Minimálně 3 minuty při 4 °C Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.								
Ligace adaptérů									
2.35	Rozmrazte Agendia NGS Ligation Master Mix na ledu. Rozmrazte Agendia NGS Oligo Adaptor Mix na ledu. Připravte Adaptor Ligation Mix podle tabulky níže. Poznámka: Vortexujte každé činidlo po dobu 10 sekund.								
	<table><tr><th>Činidlo</th><th>Objem na reakci</th></tr><tr><td>Agendia NGS Ligation Master Mix</td><td>5,0 µL</td></tr><tr><td>Agendia NGS Oligo Adaptor Mix</td><td>5,0 µL</td></tr><tr><td><i>Celkový objem</i></td><td>10,0 µL</td></tr></table>	Činidlo	Objem na reakci	Agendia NGS Ligation Master Mix	5,0 µL	Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	5,0 µL	<i>Celkový objem</i>	10,0 µL
	Činidlo	Objem na reakci							
	Agendia NGS Ligation Master Mix	5,0 µL							
	Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	5,0 µL							
<i>Celkový objem</i>	10,0 µL								
Vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.									

	U menšího počtu vzorků lze složky činidel přidat jednotlivě do každé vzorkové jamky. Při jednotlivém přidávání pipetujte Agendia NGS Ligation Master Mix pomalu, abyste zajistili, že bude použit celý objem.
2.36	Umístěte destičku Adenylát/Ligace na led, poté přidejte 10 µL Adaptor Ligation Mix do každé vzorkové jamky. Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.

2.37	<p>Použijte následující program tepelného cyklovače:</p> <p>Nepoužívejte vyhřáté víko. Pokud vyhřívání víka nelze deaktivovat, program by měl být spuštěn s otevřeným víkem.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 15 minut při 20 °C 2. Minimálně 3 minuty při 4 °C <p>Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.</p>
------	--

Vyčistěte adaptérově ligovanou cDNA (Adaptor Ligated cDNA) pomocí kuliček AMPure XP	
2.38	<p>Nechte kuličky AMPure XP dosahovat pokojové teploty alespoň po dobu 30 minut. Vortexujte suspenzi kuliček, dokud není homogenní.</p> <p>Rozmrázte Agendia NGS PCR Master Mix při pokojové teplotě. Po rozmrazení vložte do ledu.</p> <p>Rozmrázte Uracilovou DNA glykosylázu (UDG) Agendia NGS, Agendia NGS Forward PCR Primer a Agendia NGS Reverse PCR Primer v ledu.</p>
2.39	Přidejte 90 µL homogenní suspenze kuliček do každé jamky nové, 96jamkové MIDI destičky po 0,8 mL.
2.40	Přeneste 50 µL vzorkové směsi do příslušné 0,8mL jamky 96jamkové MIDI destičky.
2.41	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.
2.42	Vzorky inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
2.43	Umístěte destičku na magnetický stojan při pokojové teplotě alespoň na 5 minut.
2.44	S destičkou stále na magnetickém stojanu opatrně vyjměte a zlikvidujte vyčištěný roztok z každé jamky. Při odstraňování roztoku se nedotýkejte kuliček.
2.45	S destičkou stále na magnetickém stojanu nadávkujte do každé jamky 200 µL čerstvého 70% ethanolu.
2.46	Počkejte 10 sekund (nebo dokud nebude roztok čirý), aby se všechny kuličky usadily, a poté opatrně odstraňte ethanol.
2.47	Opakujte - celkem 2 mytí.
2.48	V případě potřeby MIDI destičku krátce odstředte, poté ji vraťte do magnetického stojanu a odstraňte zbývající kapičky ethanolu pomocí pipety.
2.49	Sušte vzorky na tepelném bloku při 37 °C po dobu 3 minut. Nepřesušte vzorky, ale zároveň se ujistěte, že je odstraněn veškerý ethanol.
2.50	Do každé jamky na vzorek přidejte 23 µL vody bez nukleázy.
2.51	Destičku uzavřete, dobře vortexujte a krátce ji odstředte, aby se kapalina nashromáždila.
2.52	Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
2.53	Umístěte MIDI destičku na magnetický stojan a inkubujte po dobu 5 minut nebo dokud není roztok čirý.
2.54	Odeberte 22 µL vyčištěného precipitátu a přidejte jej do nové 96jamkové destičky o objemu jamky 0,2 mL.

Amplifikace adaptérově ligované knihovny cDNA	
2.55	Připravte Pre-Capture PCR Mix na ledu podle tabulky níže.

	Poznámka: Vortexujte čínidlo Agendia NGS PCR Master Mix po dobu 30 sekund před smícháním.	
	Čínidlo	Objem na reakci
	Agendia NGS PCR Master Mix	25,0 µL
	Agendia NGS Uracil DNA glykosyláza (UDG)	1,0 µL
	Agendia NGS Forward PCR Primer	1,0 µL
	Agendia NGS Reverse PCR Primer	1,0 µL
	Celkový objem	28,0 µL
	Vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.	
2.56	Přidejte 28 µL Pre-Capture PCR Mix do každé vzorkové jamky. Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.	
2.57	<p>Použijte následující program tepelného cyklovače:</p> <p>Zahřejte víko na 95 °C.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 15 minut při 37 °C 2. 2 minut při 95 °C 3. 30 sekund při 95 °C 4. 30 sekund při 65 °C 5. 1 minutu při 72 °C 6. Opakujte kroky 3-5 po celkem 14 cyklů 7. 5 minut při 72 °C 8. Minimálně 3 minuty při 4 °C <p>Uchovávejte při 4 °C nebo na ledu, dokud nebudete připraveni pokračovat.</p>	

Vyčistěte adaptérově ligovanou cDNA (Adaptor Ligated cDNA) pomocí kuliček AMPure XP	
2.58	Nechte kapky AMPure XP dosahovat pokojové teploty po dobu alespoň 30 minut. Vortexujte suspenzi kuliček, dokud není homogenní.
2.59	Přidejte 90 µL homogenní suspenze kuliček do každé jamky nové, 96jamkové MIDI destičky po 0,8 mL.
2.60	Přeneste 50 µL vzorkové směsi do příslušné 0,8mL jamky 96jamkové MIDI destičky.
2.61	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.
2.62	Vzorky inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě
2.63	Umístěte destičku na magnetický stojan při pokojové teplotě alespoň na 5 minut.
2.64	S destičkou stále na magnetickém stojanu opatrně vyjměte a zlikvidujte vyčištěný roztok z každé jamky. Při odstraňování roztoku se nedotýkejte kuliček.
2.65	S destičkou stále na magnetickém stojanu nadávkujte do každé jamky 200 µL čerstvého 70% ethanolu.
2.66	Počkejte 10 sekund (nebo dokud nebude roztok čirý), aby se všechny kuličky usadily, a poté opatrně odstraňte ethanol.
2.67	Opakujte - celkem 2 mytí.
2.68	V případě potřeby MIDI destičku krátce odstředte, poté ji vraťte do magnetického stojanu a odstraňte zbývající kapičky ethanolu pomocí pipety.
2.69	Sušte vzorky na tepelném bloku při 37 °C po dobu 3 minut. Nepřesušte vzorky, ale zároveň se ujistěte, že je odstraněn veškerý ethanol.
2.70	Do každé jamky na vzorek přidejte 26 µL vody bez nukleázy.
2.71	Destičku uzavřete, dobře vortexujte a krátce ji odstředte, aby se kapalina nashromáždila.
2.72	Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
2.73	Umístěte MIDI destičku na magnetický stojan a inkubujte po dobu 5 minut nebo dokud není roztok čirý.

2.74	Odeberte 25 µL vyčištěného precipitátu a přidejte do nové 96jamkové destičky o objemu 0,2 mL.
Bod zastavení: Pokud nepokračujete dalším krokem, destičku uzavřete a skladujte při -15 °C a -20 °C.	
Kvantifikujte a normalizujte amplifikovanou, adaptérově ligoanou cDNA	
2.75	Kvantifikujte amplifikovanou, adaptérově ligoanou předzáchytnou knihovnu (Amplified Adapter Ligated Pre-Capture library) pomocí vhodné platformy pro analýzu fragmentů nukleové kyseliny v oblasti mezi 150 bp-550 bp. Alikvotujte celkem 200 ng cDNA předzáchytné knihovny.
2.76	Pomocí vakuové centrifugy lyofilizujte 200 ng cDNA předzáchytné knihovny a rekonstituujte v 3,4 µL vody bez nukleázy. <u>Nepřesušte</u> . Dobře vortexujte a krátce odstředte.
Bod zastavení: Pokud nepokračujete dalším krokem, skladujte zkumavky mezi -15 °C a -20 °C.	

Krok 3: Cílové obohacení Agendia NGS Target Enrichment

Hybridizování knihovny			
3.1	Připravte kyblík ledu a rozmrazujte činidla podle popisu níže:		
	Mix A Hyb Buffer	Mix B Prepped Library	Mix C Capture Library
	Agendia NGS Hyb #1 Pokožová teplota	Indexovací blok Agendia NGS #1 4 °C (led)	Agendia NGS RNase Block Odstavte z teploty -20 °C pouze při přípravě směsi Mix C
	Agendia NGS Hyb #2 Pokožová teplota	Agendia NGS Blok #2 4 °C (led)	Knihovna návnad MammaPrint BluePrint NGS Baits Library 4 °C (led)
	Agendia NGS Hyb #3 Pokožová teplota	Indexovací blok Agendia NGS #3 4 °C (led)	
	Agendia NGS Hyb #4 Pokožová teplota		
3.2	Připravte Library Mix A podle tabulky níže do 1,5mL zkumavky při pokojové teplotě.		
	Činidlo	Objem pro 1 reakci	
	Agendia NGS Hyb #1	6,63 µL	
	Agendia NGS Hyb #2	0,27 µL	
	Agendia NGS Hyb #3	2,65 µL	
	Agendia NGS Hyb #4	3,45 µL	
Celkový objem		13,0 µL	
Jemně promíchejte na vortexu, krátce odstředte a udržujte při pokojové teplotě.			
3.3	Připravte si novou sadu zkumavek 8-strip tube a označte ji jako „A“, poté alikvotujte 13 µL (na 1 vzorek) mixu Library Mix A do každé zkumavky.		
	Zkumavky udržujte při pokojové teplotě.		
3.4	Připravte Library Mix B podle tabulky níže do 0,5mL zkumavky na ledu.		
	Činidlo	Objem pro 1 reakci	
	Indexovací blok Agendia NGS #1	2,5 µL	
	Agendia NGS Blok #2	2,5 µL	
	Indexovací blok Agendia NGS #3	0,6 µL	

	<table> <tr> <td>Celkový objem</td><td>5,6 µL</td></tr> </table>	Celkový objem	5,6 µL								
Celkový objem	5,6 µL										
	Jemně mix vortexujte, krátce odstředte a nechte na ledu.										
3.5	<p>Připravte si nové zkumavky 8-strip tube a označte je jako „B“ a poté</p> <ol style="list-style-type: none"> Alikvotujte 5,6 µL z mixu Library Mix B do každé jamky. Přidejte 3,4 µL vzorku do každé jednotlivé jamky. Jemně 10krát promíchejte pipetováním nahoru a dolů. 										
3.6	<p>Umístěte zkumavky 8-strip tube, obsahující Library Mix B a vzorek na termocykler a spusťte následující program:</p> <p>Zahřejte víko na 105 °C.; objem mějte nastavený na 29 µL, pokud je to možné</p> <ol style="list-style-type: none"> 5 minut při 95 °C 5 minut při 65 °C Udržujte při teplotě 65 °C 										
3.7	<p>Připravte Library Mix C podle tabulky níže do 0,5mL zkumavky na 4°C led.</p> <table> <tr> <th>Činidlo</th><th>Objem pro 1 reakci</th></tr> <tr> <td>Agendia NGS voda bez nukleázy</td><td>4,5 µL</td></tr> <tr> <td>Agendia NGS RNase Block</td><td>0,5 µL</td></tr> <tr> <td>Knihovna návnad MammaPrint Blueprint NGS Baits Library</td><td>2,0 µL</td></tr> <tr> <td>Celkový objem</td><td>7,0 µL</td></tr> </table> <p>Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Ujistěte se, že se v mixu nevyskytují žádné bubliny.</p> <p>Poznámka: Připravte Mix C okolo 5 minut při 65 °C u kroku 3.6. Udržujte směs při pokojové teplotě krátce, pouze dokud nepřidáte Mix A do Mixu C. Roztoky obsahující knihovnu návnad MammaPrint Blueprint NGS Baits Library neponechávejte při pokojové teplotě po delší dobu.</p>	Činidlo	Objem pro 1 reakci	Agendia NGS voda bez nukleázy	4,5 µL	Agendia NGS RNase Block	0,5 µL	Knihovna návnad MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	2,0 µL	Celkový objem	7,0 µL
Činidlo	Objem pro 1 reakci										
Agendia NGS voda bez nukleázy	4,5 µL										
Agendia NGS RNase Block	0,5 µL										
Knihovna návnad MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	2,0 µL										
Celkový objem	7,0 µL										
3.8	Označte novou zkumavku 8-strip tube jako „C“ a přidejte 7 µL Library Mix C do každé zkumavky 8-strip tube.										
3.9	Napipetujte 13 µL Library Mix A do zkumavek 8-strip tube s Library Mix C . Dobře promíchejte vortexováním po dobu 5 sekund a krátce odstředte. Udržujte směs při pokojové teplotě pouze krátkodobě, dokud není použita v kroku 3.10.										
3.10	Zatímco termocykler je pořád na 65 °C, napipetujte vše z Library Mix A+C do jamek na vzorky, obsahujících Library Mix B . Ujistěte se, že je celý obsah Library Mix A+C přenesen do Library Mix B .										
3.11	10krát jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů a zavřete víko. Pokud jamky pořád obsahují bubliny, proveďte rychlé odstředění.										
3.12	<p>Ujistěte se, že jsou všechna víčka zkumavek utěsněná. Zavřete víko termocykleru a spusťte následující program:</p> <ol style="list-style-type: none"> 17-24 hodin při 65 °C Udržujte při teplotě 65 °C 										

Připravte kuličky Streptavidinu	
3.13	Vortexujte a alikvotujte 650 µL pufru Agendia NGS Wash Buffer 2 do dvoumililitrových zkumavek (pro každý vzorek).

3.14	Vložte alikvotované zkumavky do 65 °C zahřívacího bloku po dobu alespoň 30 minut.
3.15	Vortexujte kuličky Dynabeads MyOne Streptavidin T1 po dobu alespoň 30 sekund, aby nebyly kuličky nashromážděné u sebe.
3.16	Alikvotujte 50 µL kuliček (na jeden vzorek) do 2mL zkumavek. (Maximálně 200 µL kuliček, na 4 vzorky, na zkumavku)
3.17	Umyjte kuličky streptavidinu: <ul style="list-style-type: none"> a. Přidejte 200 µL (MNOŽSTVÍ NA JEDEN VZOREK) pufru Agendia NGS Binding Buffer do zkumavky o objemu 2 mL. (Maximálně 800 µL pufru, na 4 vzorky, na zkumavku) b. Kuličky míchejte na vortexovém mixéru po dobu 5 sekund a krátce odstředte. c. Umístěte 2,0mL zkumavky na magnetický separátor na 2 minuty a nechte roztok vyčeřit. d. Supernatant odstraňte a zlikvidujte. e. Opakujte kroky a) až d) po celkem 3 mytí.
3.18	Resuspendujte kuličky ve 200 µL (na jeden vzorek) Agendia NGS Binding Buffer a alikvotujte je v PCR zkumavkách 8-strip tube.

Zachyťte hybridy pomocí streptavidinových kuliček	
3.19	Během udržování vzorků při 65 °C na termocykleru přeneste 29 µL z 17-24 hodinové inkubace Hybridizační knihovny do zkumavek 8-strip tube, obsahujících 200 µL promytých streptavidinových kuliček (promyté streptavidinové kuličky uchovávejte při pokojové teplotě).
3.20	Uzavřete zkumavky 8-strip tube a promíchejte je otočením zkumavek a rychlým odstředěním.
3.21	Inkubujte vzorek na tepelném mixéru při teplotě 27 °C 1400 ot./min po dobu 30 minut. Poznámka: Po 5 minutách zkontrolujte, zda se kuličky neshlukují. Pokud se vytvořily shluky kuliček, rychle zkumavku vortexujte. Po 30 minutách inkubace nastavte tepelný mixér na 65 °C.
3.22	Zkumavky krátce odstředte.
3.23	Umístěte destičku na 2 minuty na magnetický separátor, aby se shromáždily kuličky ze suspenze.
3.24	Supernatant odstraňte a zlikvidujte.
3.25	Resuspendujte kuličky ve 200 µL pufru Agendia NGS Wash Buffer 1 - mícháním na vortexovém mixéru po dobu 5 sekund.
3.26	Inkubujte vzorky po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
3.27	Oddělte kuličky a pufr na magnetickém separátoru po dobu 2 minut a odstraňte supernatant.
3.28	Kuličky omyjte pomocí pufru Agendia NGS Wash Buffer 2 : <ul style="list-style-type: none"> a. Resuspendujte kuličky ve 200 µL promývacího pufru Agendia NGS Wash Buffer 2, předehřátého na 65 °C. b. Zkumavky uzavřete a míchejte je na vortexovém mixéru po dobu 5 sekund, aby se kuličky znovu

	<p>suspendovaly. Krátce odstředte.</p> <p>c. Inkubujte zkumavky na tepelném shakeru po dobu 10 minut při 65 °C a 1200 ot./min. Pokud si všimnete, že se kuličky usazují, zkumavky občas otočte, aby se promíchaly.</p> <p>d. Krátce zkumavky odstředte v odstředivce nebo v minidestičkové odstředivce.</p> <p>e. Na 2 minuty umístěte zkumavky na magnetický separátor.</p> <p>f. Supernatant odstraňte a zlikvidujte.</p> <p>g. Opakujte kroky a) až f) - celkem 3 mytí.</p> <p>h. Po dokončení 3. promývání se ujistěte, že byl odstraněn veškerý promývací pufr.</p>
3.29	Vortexujte kuličky v 31,5 µL pufru Agendia NGS Elution Buffer po dobu 5 sekund , aby se kuličky znovu suspendovaly. Krátce odstředte.
3.30	Inkubujte vzorky po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
3.31	Oddělte kuličky a pufr vložením na magnetický separátor po dobu 2 minut.
3.32	Přeneste 30 µL supernatantu do nové zkumavky/destičky. Kuličky odstraňte.
3.33	Přidejte 30 µL neutralizačního pufru Agendia NGS Neutralization Buffer do zachycené knihovny cDNA.

Vyčistěte zachycenou knihovnu pomocí kuliček AMPure XP	
3.34	<p>Nechte kuličky AMPure XP beads dosahovat pokojové teploty, a to po dobu alespoň 30 minut. Vortexujte suspenzi kuliček, dokud není homogenní.</p> <p>Pokud budete pokračovat částí „Amplifikujte zachycené knihovny k přidání indexových štítků“, rozmrazte Agendia NGS PCR Master Mix, primer Agendia NGS Post-Capture PCR Primer a indexovou destičku Agendia NGS 8bp Index Plate a vložte je do ledu.</p>
3.35	Přidejte 108 µL homogenní suspenze kuliček do každé jamky nové, 96jamkové MIDI destičky po 0,8 mL.
3.36	Přidejte 60 µL vzorkové směsi z kroku 3.33.
3.37	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.
3.38	Vzorky inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě
3.39	Umístěte destičku na magnetický stojan při pokojové teplotě alespoň na 5 minut.
3.40	S destičkou stále na magnetickém stojanu opatrně vyjměte a zlikvidujte vyčištěný roztok z každé jamky. Při odstraňování roztoku se nedotýkejte kuliček.
3.41	S destičkou stále na magnetickém stojanu nadávkujte do každé jamky 200 µL čerstvého 70% ethanolu.
3.42	Počkejte 10 sekund (nebo dokud nebude roztok čirý), aby se všechny kuličky usadily, a poté opatrně odstraňte ethanol.
3.43	Opakujte - celkem 2 mytí.
3.44	V případě potřeby MIDI destičku krátce odstředte, poté ji vraťte do magnetického stojanu a odstraňte zbývající kapičky ethanolu pomocí pipety.
3.45	Sušte vzorky na tepelném bloku při 37 °C po dobu 3 minut. Nepřesušte vzorky, ale zároveň se ujistěte, že je odstraněn veškerý ethanol.
3.46	Do každé jamky na vzorek přidejte 36 µL vody bez nukleázy.

3.47	Destičku uzavřete, dobře vortexujte a krátce ji odstředte, aby se kapalina nashromáždila.
3.48	Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
3.49	Umístěte MIDI destičku na magnetický stojan a inkubujte po dobu 5 minut nebo dokud není roztok čirý.
3.50	Odeberte 35 µL vyčištěného supernatantu a přidejte ho do nové 96jamkové destičky po 0,2 mL nebo do nových zkumavek.
Bod zastavení: Pokud nepokračujete dalším krokem, uzavřete destičku a skladujte ji při teplotě -15 °C až -20 °C.	

Amplifikujte zachycené knihovny k přidání indexových štítků									
3.51	<p>Rozmrázte Agendia NGS PCR Master Mix, primer Agendia NGS Post-Capture PCR Primer a indexovou destičku Agendia NGS 8bp Index Plate a vložte je do ledu. Poznámka: Agendia NGS PCR Master Mix je viskózní, před přidáním PCR primerů jej vortexujte po dobu 30 sekund.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Činidla</th><th>Objem pro 1 reakci</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agendia NGS PCR Master Mix</td><td>25 µL</td></tr> <tr> <td>Agendia NGS Post-Capture PCR primer</td><td>1 µL</td></tr> <tr> <td>Celkový objem</td><td>26 µL</td></tr> </tbody> </table> <p>Připravte Post-Capture PCR Mix podle tabulky níže do 1,5mL zkumavky v ledu. Směs opatrně vortexujte a otočte. Nechte na ledě.</p>	Činidla	Objem pro 1 reakci	Agendia NGS PCR Master Mix	25 µL	Agendia NGS Post-Capture PCR primer	1 µL	Celkový objem	26 µL
Činidla	Objem pro 1 reakci								
Agendia NGS PCR Master Mix	25 µL								
Agendia NGS Post-Capture PCR primer	1 µL								
Celkový objem	26 µL								
3.52	Aby byl každý vzorek amplifikován, umístěte 26 µL Post-Capture PCR Mix do PCR jamkové destičky.								
3.53	<p>Přidejte 5 µL příslušného indexovacího primeru (z Agendia NGS 8bp Index Plate) do každé jamky obsahující Post-Capture PCR Mix. Pro každý vzorek, který má být sekvenován ve stejné dráze, použijte jiný indexovací primer.</p>								
3.54	<p>Přidejte 19 µL purifikované knihovny z kroku 3.50 do každé jamky obsahující Post-Capture PCR Mix. 10krát promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Destičku krátce odstředte.</p>								
3.55	<p>Umístěte PCR destičku do termocykleru. Spusťte následující program termocykleru:</p> <p>Zahřejte víko na 105 °C</p> <ol style="list-style-type: none"> 2 minut při 95 °C 30 sekund při 95 °C 30 sekund při 57 °C 1 minutu při 72 °C Opakujte kroky 2-4 po celkem 12 cyklů 5 minut při 72 °C Udržujte při teplotě 4 °C 								

Vyčistěte amplifikované zachycené knihovny pomocí kuliček AMPure XP Beads.	
3.56	Nechte kuličky AMPure XPBeads dosahovat pokojové teploty, a to po dobu alespoň 30 minut. Vortexujte suspenzi kuliček, dokud není homogenní.
3.57	Přidejte 90 µL homogenní suspenze kuliček do každé jamky nové, 96jamkové MIDI destičky po 0,8 mL.
3.58	Přeneste 50 µL vzorkové směsi do příslušné 0,8mL jamky 96jamkové MIDI destičky.
3.59	Destičku uzavřete, vortexujte a krátce odstředte.
3.60	Vzorky inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě
3.61	Umístěte destičku na magnetický stojan při pokojové teplotě alespoň na 5 minut.
3.62	S destičkou stále na magnetickém stojanu opatrně vyjměte a zlikvidujte vyčištěný roztok z každé jamky. Při odstraňování roztoku se nedotýkejte kuliček.
3.63	S destičkou stále na magnetickém stojanu nadávkujte do každé jamky 200 µL čerstvého 70% ethanolu.
3.64	Počkejte 10 sekund (nebo dokud nebude roztok čirý), aby se všechny kuličky usadily, a poté opatrně odstraňte ethanol.
3.65	Opakujte - celkem 2 mytí.
3.66	V případě potřeby MIDI destičku krátce odstředte, poté destičku vraťte do magnetického stojanu a pipetou odstraňte zbývající kapičky ethanolu.
3.67	Sušte vzorky na tepelném bloku při 37 °C po dobu 3 minut. Nepřesušte vzorky, ale zároveň se ujistěte, že je odstraněn veškerý ethanol.
3.68	Přidejte 22,5 µL pufru Buffer EB do každé vzorkové jamky.
3.69	Destičku uzavřete, dobře vortexujte a krátce ji odstředte, aby se kapalina nashromáždila.
3.70	Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
3.71	Umístěte MIDI destičku na magnetický stojan a inkubujte po dobu 5 minut nebo dokud není roztok čirý.
3.72	Odeberte 21 µL vyčištěného supernatantu do nové 96jamkové destičky nebo do nových zkumavek.
Bod zastavení: Pokud nepokračujete dalším krokem, uzavřete destičku a uložte 21 µL indexovaných knihoven při teplotě mezi -15 °C a -20 °C.	

Kontrola kvality 3: Hodnocení kvality amplifikovaných, cílově obohacených, indexovaných knihoven

Ověřte velikostní distribuce každé amplifikované, zachycené, indexované knihovny pomocí vhodné platformy pro analýzu fragmentů nukleové kyseliny. Fragmentová velikostní distribuce by se měla pohybovat mezi 150-700 bp. Pro přesnou kvantifikaci se ujistěte, že koncentrace spadá do lineárního rozsahu testu (5-500 pg/µL).

Zásobní molarita [pmol/L]	Cílová molarita [nM]
≥ 4000	4

2000-3999	2
1000-1999	1
< 1000	Neprovádět, neúspěšný vzorek

Krok 4: Nahrávání Agendia NGS MiSeq Loading

Příprava vzorkového listu																																																																		
4.1	<p>Připravte vzorkový list MiSeq ve formátu s hodnotami oddělenými čárkami (CSV) podle pokynů níže. Jedná se o 150bp single-end protokol.</p> <p>Prosím obraťte se na support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html pro obecné pokyny. Příklad vzorkového listu MiSeq můžete nalézt zde: www.agendia.com/diagnostic-products/resources</p> <p>Pod [Název]</p> <table border="1"> <tr> <td>Jméno výzkumného pracovníka:</td> <td colspan="5">Povinné, <i>dodáno uživatelem</i></td> </tr> <tr> <td>Název projektu</td> <td colspan="5">Povinné, <i>dodáno uživatelem</i></td> </tr> <tr> <td>Název experimentu</td> <td colspan="5">Povinné, <i>dodáno uživatelem</i></td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td colspan="5">Povinné</td> </tr> <tr> <td>Pracovní postup</td> <td colspan="5">Povinné [GenerovatFASTQ]</td> </tr> <tr> <td>Test</td> <td colspan="5">Povinné [SureSelect]</td> </tr> <tr> <td>Chemie</td> <td colspan="5">Povinné [Výchozí]</td> </tr> </table> <p>V části [Počet přečtení]: 150</p> <p>V části [Nastavení]</p> <table border="1"> <tr> <td>Generovat pouze FASTQ (OnlyGenerateFASTQ)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Filtrovat PCR duplikáty (FilterPCRDuplicates)</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>V části [Data]:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ID vzorku</th> <th>Název vzorku</th> <th>Destička vzorku</th> <th>Jamka vzorku</th> <th>Projekt vzorku</th> <th>Index</th> <th>I7_Index_ID</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Povinné, <i>dodáno uživatelem</i></td> <td>Volitelné</td> <td>Volitelné</td> <td>Volitelné</td> <td>Volitelné</td> <td>Povinné [Sekvence indexu]</td> <td>Volitelné</td> </tr> </tbody> </table> <p>Poznámka: Každý vzorek musí mít jedinečné „ID vzorku“; „Název vzorku“ bude obsažen v názvech souborů FASTQ</p> <p>Uložit list. Po vložení průtokové kyvety (flow cell) a činidla do sekvenceru vyzve software uživatele, aby nahrál Vzorkový list.</p>						Jméno výzkumného pracovníka:	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>					Název projektu	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>					Název experimentu	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>					Datum	Povinné					Pracovní postup	Povinné [GenerovatFASTQ]					Test	Povinné [SureSelect]					Chemie	Povinné [Výchozí]					Generovat pouze FASTQ (OnlyGenerateFASTQ)	1	Filtrovat PCR duplikáty (FilterPCRDuplicates)	0	ID vzorku	Název vzorku	Destička vzorku	Jamka vzorku	Projekt vzorku	Index	I7_Index_ID	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>	Volitelné	Volitelné	Volitelné	Volitelné	Povinné [Sekvence indexu]	Volitelné
	Jméno výzkumného pracovníka:	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>																																																																
	Název projektu	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>																																																																
	Název experimentu	Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>																																																																
	Datum	Povinné																																																																
	Pracovní postup	Povinné [GenerovatFASTQ]																																																																
	Test	Povinné [SureSelect]																																																																
	Chemie	Povinné [Výchozí]																																																																
	Generovat pouze FASTQ (OnlyGenerateFASTQ)	1																																																																
	Filtrovat PCR duplikáty (FilterPCRDuplicates)	0																																																																
ID vzorku	Název vzorku	Destička vzorku	Jamka vzorku	Projekt vzorku	Index	I7_Index_ID																																																												
Povinné, <i>dodáno uživatelem</i>	Volitelné	Volitelné	Volitelné	Volitelné	Povinné [Sekvence indexu]	Volitelné																																																												
4.2	<p>Připravte cartridge s činidly podle doporučení společnosti Illumina.</p>																																																																	
<p>Vkládání konečných knihoven do společného fondu (tj. Sdružování knihoven) pro multiplexované sekvenování</p>																																																																		

4.3	Použitý sekvenační protokol (1 nM , 2 nM nebo 4 nM) závisí na vzorcích na připraveném vzorkovém listu. Naředte každý vzorek individuálně na cílovou molaritu (tj. 1 nM, 2 nM nebo 4 nM). Pokud je třeba sloučit vzorky s různou cílovou molaritou do jednoho cyklu MiSeq, zředte všechny vzorky na nejnižší cílovou společnou molaritu a vložte do společného fondu.
4.4	Odeberte 5 µL z každého vzorku a vložte je do jedné zkumavky o objemu 1,5 mL.
4.5	Vortexujte, krátce odstředte a vložte do ledu.

Denaturujte sdruženou cDNA knihovnu				
4.6	Připravte si novou zkumavku s 0,2 N NaOH (0,2 N NaOH je stabilní maximálně 12 hodin) Denaturujte sdruženou knihovnu podle použitého sekvenačního protokolu:			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Sdružená knihovna (knihovna ve společném fondu)	10 µL	5 µL	5 µL
	0,2 N NaOH	10 µL	5 µL	5 µL
4.7	Krátce promíchejte na vortexu a odstředte při 280 × g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.			
4.8	Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.			
Zředte denaturovanou knihovnu cDNA				
4.9	Zředte denaturovanou cDNA knihovnu předem vychlazeným HT1 pufrém podle použitého sekvenačního protokolu: Poznámka: K míchání invertujte pufr HT1.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Denaturovaná cDNA knihovna	20 µL	10 µL	10 µL
	HT1	480 µL	490 µL	990 µL
	Koncentrace	20 pM	20 pM	20 pM
4.10	Několikrát promíchejte invertováním, krátce odstředte a vložte na led.			
4.11	V nové 1,5mL zkumavce dále naředte denaturovanou knihovnu z kroku 4.10 podle sekvenačního protokolu, abyste získali požadovanou konečnou vstupní koncentraci.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Denaturovaná DNA	500 µL	500 µL	450 µL
	HT1	167 µL	167 µL	150 µL
	Finální koncentrace	15 pM	15 pM	15 pM
4.12	Několikrát invertujte, aby se směs promíchala, a poté pulzně odstředte. Umístěte do ledu, dokud nebudete připraveni k vložení do cartridge s činidly.			
Kombinujte knihovnu vzorků a PhiX control (volitelné)				
4.13	Připravte 20 pM PhiX podle protokolu Illumina's MiSeq Protocol nebo rozmrazte 20 pM knihovny PhiX (pokud byla již dříve připravena) na ledu. Obrácením promíchejte a krátce odstředte.			
4.14	Zkombinujte následující objemy PhiX control a knihovny vzorků do 1,5mL zkumavky: a. 6 µL Denaturované, naředěné 20 pM PhiX knihovny b. 594 µL denaturované, naředěné knihovny vzorků (pokud není přidán žádný PhiX, přidejte 600 µL denaturované, naředěné knihovny vzorků)			
4.15	Několikrát invertujte, aby došlo k promíchání, a krátce odstředte. Nechte stranou v ledu, dokud nebudete připraveni k vložení do cartridge s činidly.			
4.16	Na úvítací obrazovce softwarového rozhraní vyberte „Sequence“ pro zahájení kroků nastavení běhu sekvence.			
4.17	Nahrajte cartirdge s činidly MiSeq s knihovnou vzorků a PhiX control. Pokračujte v sekvenování podle protokolu MiSeq společnosti Illumina a vygenerujte soubory FASTQ.			

Krok 5: Analýza souborů FASTQ prostřednictvím nástroje ADAPT

Soubory FASTQ, vygenerované sekvenátorem MiSeq, budou zpracovány nástrojem Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT), což je vysoce výkonná a bezpečná cloudová platforma pro analýzu genomiky. ADAPT je určen k použití v kombinaci se sadou MammaPrint® BluePrint® pro recidivu rakoviny prsu a molekulární subtypování (MammaPrint BluePrint Kit). ADAPT poskytuje integrovanou analýzu a hlášení výsledků vzorků, zpracovaných pomocí sady MammaPrint BluePrint Kit.

Podrobné pokyny jsou uvedeny v uživatelské příručce ADAPT (M-ROW-169), včetně toho, jak vytvořit účet, jak nainstalovat konektor pro zabezpečení souborů, jak nahrát a analyzovat deidentifikovaná data pacientů v zabezpečeném prostředí a jak získat výsledky testu.

ADAPT je bezpečný cloudový systém a lze se k němu připojit prostřednictvím prohlížečů uvedených níže.

Prohlížeč	Podporovaná verze	Operační systém
Internet Explorer 11	Windows	Internet Explorer 11
Microsoft Edge	Nejnovější stabilní verze Windows 10	Microsoft Edge
Google Chrome	Nejnovější stabilní verze Windows, Mac a Linux	Google Chrome
Mozilla Firefox	Nejnovější stabilní verze Windows, Mac a Linux	Mozilla Firefox
Safari	11.x	Mac

Než začnete, přečtěte si všechny pokyny uvedené v uživatelské příručce ADAPT (M-ROW-169). Máte-li i po přečtení těchto pokynů další otázky, kontaktujte, prosím, zákaznický servis Agendia.

Výsledky

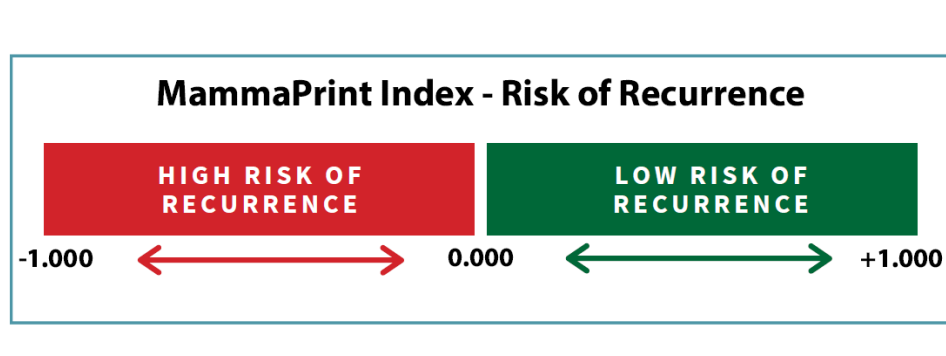
Ke každému vzorku uživatel obdrží dva dokumenty – Technickou zprávu a Vysvětlení výsledků. Technická zpráva bude obsahovat informace o vzorku a zpracování ADAPT, včetně informací o kontrole kvality a výsledcích sady MammaPrint BluePrint Kit, které zahrnují MammaPrint Index (MPI), určení rizika recidivy (‚Vysoké riziko‘ nebo ‚Nízké riziko‘) a výsledek BluePrint testu (Typ Luminal, HER2 nebo Basal). Podrobnější informace naleznete v sekci ‚Interpretace výsledků‘. Sekce ‚Vysvětlení výsledků‘ (Explanation of Results) vysvětluje výsledky testu v kontextu publikovaných klinických údajů.

Interpretace výsledků

Výsledek testu je považován za platný, pouze pokud je v poli Celkové hodnocení v Technické zprávě uvedeno „Splněno“. Pokud některá z metrik kontroly kvality selže, Celkové hodnocení poté uvede „Nesplnil“. Pokud je v Celkovém hodnocení uvedeno „nesplnil“, v Technické zprávě se v části Výsledky testu zobrazí „Pro tento vzorek nelze poskytnout výsledek“ a dokument ‚Vysvětlení výsledků‘ nebude poskytnut. Zkušební laboratoř se může rozhodnout znovu otestovat vzorek, aby zjistila, zda bude následný výsledek testu platný.

MammaPrint

Výsledek MammaPrint je poskytován jako binární výsledek a to sice buď jako „Nízké riziko“ nebo „Vysoké riziko“ recidivy. Prognostický profil (‚Nízké riziko‘, ‚Vysoké riziko‘) vzorku se stanoví výpočtem MPI na stupnici od -1.000 do +1.000 (rozsah MammaPrint FFPE, Obrázek 2). Výsledky s profilem ‚Vysoké riziko‘ mají MammaPrint index (MPI) roven nebo nižší než 0,000, zatímco výsledky s profilem ‚Nízké riziko‘ mají MPI nad 0,000. Pokud MPI spadá do předem definované oblasti kolem mezní hodnoty klasifikace, tj. mezi -0,058 a +0,058, přesnost klasifikace je menší než 90 %.



Obrázek 2: MammaPrint Index

BluePrint

BluePrint je test molekulárního subtypování, který klasifikuje rakovinu prsu do tří odlišných subtypů: Typy Luminal, HER2 a Basal podle stanovení hladin mRNA 80 genů, které nejlépe rozlišují mezi těmito 3 odlišnými molekulárními subtypy. Každý z těchto subtypů má výrazné rozdíly v dlouhodobých následcích a reakci na (neo)adjuvantní chemoterapii [9]. Kombinace MammaPrint a BluePrint umožňuje rozdělení pacientek do následujících podskupin: typ Luminal/MammaPrint Nízké riziko (podobné typu Luminal A); typ Luminal/MammaPrint Vysoké riziko (podobně jako typ Luminal B); Typ HER2 a typ Basal.

Omezení u procedury

- Sada MammaPrint BluePrint pro recidivu a molekulární subtypování rakoviny prsu byla ověřena pouze pro použití s nádorovou tkání rakoviny prsu FFPE od pacientek. Testování jiných typů vzorků nebo jiné konzervační metody nebylo ověřeno.
- Souprava RNeasy FFPE byla ověřena pro použití v tomto testu. Použití jiných souprav pro izolaci RNA nebylo ověřeno.
- Sada MammaPrint BluePrint Kit byla ověřena v kombinaci s činidly Illumina MiSeq V3 na 150 cyklů. Použití jiných sekvenátorů DNA nebo jiných činidel nebylo ověřeno.
- Výsledek MammaPrint ‚Nízké riziko‘ nezaručuje, že se v rozmezí pěti let rakovina prsu neobnoví. Stejně jako výsledek ‚Vysoké riziko‘ nezaručuje, že se rakovina prsu objeví znovu. Výsledky testů by měly být použity spolu s klinicko-patologickými faktory.
- Výsledky MammaPrint BluePrint NGS jsou zamýšleny pro použití lékaři jako prognostický marker pouze společně se standardními klinicko-patologickými faktory. Test není vyroben k určení výsledku onemocnění, ani k navrhování nebo odvození individuální reakce pacienta na terapii.

Očekávané hodnoty

MammaPrint

Klinické údaje z populačních studií prokázaly klinickou užitečnost testu MammaPrint v zamýšlené populaci. MammaPrint byl klinicky ověřen v prospektivních klinických studiích pro použití u pacientek s časným (I, II a III) karcinomem prsu bez ohledu na stav Estrogenových receptorů (ER) nebo status HER2, s velikostí nádoru $\leq 5,0$ cm a 0-3 pozitivními lymfatickými uzlinami (LN0-3), bez zvláštních specifikací pro nodální mikrometastázy. Ve studii MINDACT primární analýza prokázala, že odepření chemoterapie u pacientek s klinicky vysokým rizikem/Genomový-MammaPrint-Nízké riziko (C-high/G-low) nemá škodlivý vliv na výsledek. U pacientek MammaPrint s nízkým rizikem a 1–3 pozitivními lymfatickými uzlinami nebyl pozorován žádný významný přínos adjuvantní systémové chemoterapie (po 5 letech) [11]. Z těchto a dalších publikovaných studií [7] [12] [13] [14] [15] [16] [17], bylo prokázáno, že test MammaPrint zlepšuje predikci klinického výsledku u žen s rakovinou prsu v časném stadiu.

Blueprint

Rakoviny prsu typu Basal jsou charakterizovány genovou expresí původních bazálních/myoepiteliálních buněk. Rakoviny typu Basal jsou typicky trojnásobně negativní pro ER, PR a HER2 (podobné bazálnímu typu) a mají specifický profil genové exprese. Hormonální terapie a anti-HER2 terapie, jako je trastuzumab a lapatinib, nejsou proti těmto rakovinám považovány za účinné, ale chemoterapie za užitečnou považována je.

Rakoviny prsu typu Luminal jsou charakterizovány genovou expresí luminálních epiteliálních buněk, které lemují vývody a žlázy prsu. Rakoviny typu Luminal jsou typicky nádory pozitivní na hormonální receptory a často reagují na hormonální terapii. U pacientek klasifikovaných jako MammaPrint „Nízké riziko“, typu Luminal, lze očekávat, že budou mít klinický průběh podobný typu Luminal A, který se obvykle léčí hormonální terapií, zatímco u pacientek s výsledky MammaPrint „Vysoké riziko“, typu Luminal, lze očekávat podobný klinický průběh pacientkám typu Luminal B, u kterých obvykle lépe funguje agresivnější léčba, která může zahrnovat i chemoterapii.

Rakoviny prsu typu HER2 jsou charakterizovány amplifikací nebo nadměrnou expresí lokusu HER2 a jsou typicky HER2-pozitivními nádory dle IHC nebo FISH (HER2/neu pozitivní). Tyto rakoviny mají tendenci růst rychleji a mohou se opakovat, i když je lze často léčit anti-HER2 terapiemi.

Funkční vlastnosti

Aby bylo možné odhadnout přesnost, reprodukovatelnost a mezilaboratorní reprodukovatelnost soupravy MammaPrint Blueprint pro recidivu rakoviny prsu a molekulární subtypování, byly provedeny analytické a klinické validační studie, jejichž výsledky jsou uvedeny níže.

MammaPrint

Analytický výkon

Shoda mezi testem MammaPrint na NGS a aktuálně prodávanou technologií MammaPrint FFPE na mikročipu byla hodnocena pomocí RNA z 85 vzorků FFPE. Veškeré testování bylo provedeno v laboratoři Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko). Výkonnost testu byla určena výpočtem pozitivní procentuální shody (PPA), negativní procentuální shody (NPA) a celkové shody mezi těmito dvěma testy. PPA byla 100 %, NPA 94 % a celková shoda 98 %.

Reprodukovatelnost testu MammaPrint na NGS byla hodnocena v průběhu času pomocí RNA izolované ze tří vzorků tkáně FFPE, které reprezentovaly obě rizikové kategorie MammaPrint (MammaPrint „Vysoké riziko“ a „Nízké riziko“). Vzorky byly několikrát analyzovány během různých dnů vícero laboratorními pracovníky v laboratořích Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko) a Irvine (Kalifornie, USA). Za jeden den byl proveden jeden cyklus: Vzorek 1 měl 25 měření, Vzorek 2 měl 17 měření a Vzorek 3 měl 14 měření. Střední relativní reprodukovatelnost na základě MammaPrint indexu byla 98 %.

Reprodukovatelnost byla hodnocena mezi dvěma izolacemi RNA, získanými ze stejného vzorku tkáně FFPE, pro celkových 43 vzorků. Dvě izolace ze 43 vzorků tkáně byly analyzovány ve stejný den v laboratoři Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko). Shoda výsledků MammaPrint mezi první a druhou izolací s použitím těchto 43 vzorků byla 98 %.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost byla hodnocena na dvou externích evropských pracovištích a v laboratoři Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko). Celkem byla RNA izolována z 16 vzorků FFPE a odeslána k testování na tři místa. Těchto 16 vzorků bylo rozděleno mezi nejméně dva laboratorní pracovníky na každém místě. Mezi těmito dvěma externími pracovišti a pracovištěm Agendia byla stanovena mezilaboratorní reprodukovatelnost. Celková shoda byla 100 %.

Bylo hodnoceno několik látek, aby byla určena možná interference s výsledky testů souprav MammaPrint a Blueprint NGS (např. gDNA, Prot. K, Actinomycin D, ethanol a hydroxid sodný). Žádná z testovaných látek neovlivnila výsledky testů MammaPrint a Blueprint.

Limit detekce (LoD) byl stanoven u post-capture materiálu, kde byly zachyceny rozdílné úrovně molarity na MiSeq, což vedlo k LoD 0,4 nM. Prahová hodnota molarity zachyceného materiálu je 1,0 nM, což je výrazně nad LoD.

Klinický výkon

Test MammaPrint na klinické výkonnostní charakteristiky NGS byl hodnocen pomocí studijní kohorty 316 vzorků tkáně nádoru prsu FFPE, retrospektivně shromážděných a archivovaných od pacientek s rakovinou prsu ve stádiu I nebo II, velikosti nádoru $\leq 5,0$ cm s negativními lymfatickými uzlinami nebo 1-3 pozitivními lymfatickými uzlinami, zapsanými v letech 2004 až 2006. Pro podporu klinické výkonnosti testu MammaPrint bylo 316 vzorků srovnáno s 5letými výslednými daty pro vzdálený interval bez recidivy (DRFI), což je doba do diagnózy vzdálených metastáz nebo úmrtí na rakovinu prsu. Jak bylo očekáváno, tato data prokázala významný rozdíl mezi skupinami MammaPrint s vysokým a nízkým rizikem pro 5letou DRFI (LogRank $p=0,002$). Důležité je, že klinický výkon testu MammaPrint na NGS pro skupiny s vysokým i nízkým rizikem v této kohortě studie byl statisticky ekvivalentní (vysoké riziko $p=0,83$, nízké riziko $p=0,44$) výkonu aktuálně prodávaného MammaPrint FFPE na technologii DNA čipu.

Nakonec byla provedena korelační studie v terénu, ve dvou nezávislých evropských lokalitách. Vzorky karcinomu prsu byly prospektivně odebrány od 95 pacientů v odpovídající populaci (tj. stadium I nebo stadium II onemocnění, velikost nádoru $\leq 5,0$ cm a negativní lymfatické uzliny, či 1-3 pozitivní lymfatické uzliny). Tyto vzorky byly zpracovány přímo v terénu pomocí testu MammaPrint s NGS a část tkáně byla odeslána do laboratoře Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko) k testování pomocí testu MammaPrint na NGS a také pomocí aktuálně prodávaného MammaPrint FFPE s technologií DNA čipů. Výkonnost testu byla hodnocena porovnáním výsledků NGS testu MammaPrint získaných v terénu s testy MammaPrint s NGS a MammaPrint FFPE získanými v laboratoři Agendia. Na základě 86 vzorků byla nalezena shoda mezi testem MammaPrint s NGS, provedeným v terénu, a testem MammaPrint na NGS, provedeným v Agendia, 93 %. Podobně byla shoda mezi testem MammaPrint s NGS provedeným v terénu a MammaPrint FFPE s DNA čipem provedeným v Agendia 91 %.

Blueprint

Analytický výkon

Shoda mezi testem Blueprint s NGS a aktuálně prodávanou technologií Blueprint FFPE s DNA čipem byla hodnocena pomocí 98 vzorků FFPE RNA. Veškeré testování bylo provedeno v laboratoři Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko). Výkonnost testu byla stanovena výpočtem celkové shody mezi dvěma testy, která byla 100 %.

Reprodukovatelnost testu Blueprint s NGS byla hodnocena v průběhu času a to pomocí RNA izolované ze tří vzorků tkáně FFPE, které představovaly různé úrovně výsledků Blueprint: Typ Luminal, HER2 typ a typ Basal. Vzorky byly několikrát analyzovány během různých dnů vícero laboratorními pracovníky v laboratořích Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko) a Irvine (Kalifornie, USA). Za jeden den byl proveden jeden cyklus: Vzorek 1 měl 25 měření, Vzorek 2 měl 17 měření a Vzorek 3 měl 14 měření. Střední relativní reprodukovatelnost v Blueprint indexu pro typ Luminal byla 98 %; pro typ HER2 bylo 98 %; a pro typ Basal byl 98 %.

Reprodukovatelnost byla hodnocena mezi dvěma izolacemi RNA získanými ze stejné tkáně FFPE, pro celkových 43 vzorků. Tyto dvě izolace ze 43 vzorků tkáně byly analyzovány testem BluePrint s NGS ve stejný den. Shoda mezi první a druhou izolací těchto 43 vzorků byla 100 %.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost byla hodnocena na dvou externích evropských pracovištích a v laboratoři Agendia v Amsterdamu (Nizozemsko). RNA izolovaná z 16 vzorků FFPE byla odeslána k testování na tři místa. Těchto 16 vzorků bylo rozděleno mezi nejméně dva laboratorní pracovníky na každém místě. Mezi těmito dvěma externími pracovišti a pracovištěm Agendia byla stanovena mezilaboratorní reprodukovatelnost. Celková shoda byla 100 %.

Klinický výkon

Terénní korelační studie byla provedena ve dvou nezávislých evropských lokalitách. Vzorky karcinomu prsu byly prospektivně odebrány od 95 pacientek v odpovídající populaci (tj. stadium I nebo stadium II onemocnění, velikost nádoru $\leq 5,0$ cm a negativní lymfatické uzliny, či 1-3 pozitivní lymfatické uzliny). Tyto vzorky byly zpracovány přímo v terénu pomocí testu BluePrint s NGS a část tkáně byla odeslána do laboratoře Agendia

v Amsterdamu (Nizozemsko) na zkoušení testu BluePrint s NGS a zároveň na zkoušení aktuálně prodáváného testu BluePrint FFPE s technologií DNA čipu. Výkonnost testu byla hodnocena srovnáním výsledků testu BluePrint s NGS, získaných v terénu, s výsledky testu BluePrint s NGS a výsledky BluePrint FFPE, získanými v Agendia. Shoda mezi testem BluePrint s NGS, provedeným v terénu, a testem BluePrint s NGS, provedeným v Agendia, byla pro všech 86 vzorků 100 %. Podobně shoda mezi BluePrint testem s NGS, provedeným v terénu, a BluePrint FFPE s DNA čipem, provedeným v Agendia, byla 98 %.

Asistence

Máte-li jakékoli dotazy týkající se používání tohoto produktu, kontaktujte prosím zákaznický servis Agendia na adrese customerservice@agendia.com nebo telefonicky na čísle +31 (0) 20 462 1510, pondělí až pátek od 8:30 do 17:00 (GMT/UTC +1).

Název a sídlo podnikání



Agendia NV
Radarweg 60
1043NT Amsterdam
Nizozemsko
Telefon: +31 (0)20 462 17 1510
e-mail: customerservice@agendia.com



Datum vydání

M-ROW-339-V1 (Říj2021)

Úpravy předchozí verze

První vydání – xx-xxx-2021

Upozornění:

Jakýkoli vážný incident související se sadami MammaPrint a BluePrint NGS Kit & ADAPT nahlase výrobcí a příslušnému orgánu členského státu. Výrobce ohlásí závažný incident příslušnému orgánu členského státu, ve kterém má uživatel/pacient bydliště.
















© 2021 Agendia. Všechna práva vyhrazena.

Agendia®, MammaPrint® a Blueprint® jsou ochranné známky společnosti Agendia NV a/nebo jejích přidružených společností v USA. Všechny ostatní názvy a další ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

Pokyny v tomto dokumentu musí být přísně dodržovány kvalifikovaným a řádně vyškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaného produktu. **NEPŘEČTENÍ A VÝSLOVNÉ NEDODRŽENÍ VŠECH ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE MÍT ZA NÁSLEDEK POŠKOZENÍ VÝROBKU, ZRANĚNÍ OSOB, VČETNĚ UŽIVATELŮ NEBO JINÝCH OSOB. AGENDIA NEPŘEBÍRÁ ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽÍVÁNÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ JEJICH ČÁSTÍ NEBO SOFTWARE).**

Symbols

Úplný odkaz na symboly, které se mohou objevit na obalu a štítku produktu, naleznete v následujícím klíči symbolů.

Symbol	Název symbolu	Popis symbolu
	Výrobce	Označuje výrobce zdravotnického vybavení, podle definice nařízení (EU) 2017/746
	Datum spotřeby	Označuje datum, po kterém se zdravotnický prostředek nesmí používat.
	Kód šarže	Označuje kód šarže výrobce, aby bylo možné šarži nebo sadu identifikovat.
	Katalogové číslo	Označuje katalogové číslo výrobce, aby bylo možné zdravotnický prostředek identifikovat.
	Chraňte před slunečním zářením	Označuje zdravotnický prostředek, který je potřeba chránit před zdroji světla.
	Teplotní limit	Označuje teplotní limity, kterým může být zdravotnický prostředek bezpečně vystaven.
	Prostudujte si návod k použití	Označuje, že uživatel musí nahlédnout do návodu k použití.
	Upozornění	Označuje, že je nutné, aby si uživatel prostudoval návod k použití, kde jsou obsaženy důležité varovné informace, jako jsou varování a opatření, která z různých důvodů nemohou být uvedena na samotném zdravotnickém zařízení.
	<i>In vitro</i> diagnostický zdravotnický výrobek	Označuje zdravotnický výrobek, který je určen k použití jako diagnostický zdravotnický výrobek <i>in vitro</i> .
	Nepoužívejte, pokud je balení poškozené	Označuje zdravotnický výrobek, který by neměl být použit, pokud byl obal poškozen nebo otevřen
	Obsahuje dostatek pro testy	Označuje celkový počet IVD testů, které lze provést s IVD.
	Používejte ochranu očí	Používejte ochranu očí
	Používejte ochranné rukavice	Používejte ochranné rukavice



Používejte ochranný oděv

Používejte ochranný oděv

Reference

- [1] L. J. van 'Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven and C. Robert, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, s. 530 - 535, 2002.
- [2] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, D. Hongyue, A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen and A. Glas, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, č. 25, s. 1999 - 2009, 19 Prosinec 2002.
- [3] A. M. Glas, A. Floore, L. J. Delahaye, A. T. Witteveen, P. R. C.F., N. L.-D. J. S. Bakx, T. J. Bruinsma, M. O. Warmoes, R. Bernards, L. F. Wessels and L. J. van 't Veer, "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test," *BMC Genomics*, Říjen 2006.
- [4] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J. S. Carroll, S. Tian, F. A. de Snoo, R. A. Bender, R. Bernards and A. M. Glas, "A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 133, č. 1, s. 37-47, 2012.
- [5] S. Mook, M. K. Schmidt, B. Weigelt, B. Kreike, I. Eekhout, M. J. van de Vijver, A. M. Glas, A. Floore, E. J. T. Rutgers and L. J. van 't Veer, "The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age.," *Annals of Oncology*, vol. 21, č. 4, s. 717-722, 2009.
- [6] M. Buyse, L. Sherene, v. ' V. Laura, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. Saghastchian d'Assignies, B. Jonas, R. Lideau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse and A. Floore, "Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women with Node-Negative Breast Cancer," *Journal of the Nat. Can. Int.*, vol. 98, č. 17, s. 1183 - 1192, 6. září 2006.
- [7] C. Drukker, J. Bueno-de-Mesquita, V. Retel, W. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. Roumen, M. Knauer, L. van 't Veer, G. Sonke, E. Rutgers, M. van de Vijver and S. Linn, "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study," *International Journal of Cancer*, vol. 133, s. 929 - 936, Leden 2013.
- [8] I. Beumer, A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernards, L. van 't Veer and A. Glas, "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 156, č. 2, s. 279-287, 2016.

- [9] S. Gluck, F. de Snoo, J. Peeters, L. Stork-Sloots and G. Somlo, "Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, č. 3, s. 759-767, 2013.
- [10] M. Piccart, L. J. van 't Veer, C. Poncet, J. M. N. Lopes Cardozo, S. Delaloge, J. Y. Pierga, P. Vuylsteke, E. Brain, S. Vrijaldenhoven, P. A. Neijenhuis, S. Causeret, T. J. Smilde, G. Viale, A. M. Glas, M. Delorenzi, C. Sotiriou, I. T., S. Kümmel, G. Zoppoli, A. M. Thompson, E. Matos, K. Zaman, F. Hilbers, D. Fumagalli, P. Ravdin, S. Knox, K. Tryfonidis, A. Peric, B. Meulemans, J. Bogaerts, F. Cardoso, E. J. T. Rutgers. "70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age." *Lancet Oncology*, vol. 22, č. 4, str. 476-488, 2021.
- [11] K. Yao, R. Goldschmidt, M. Turk, J. Wesseling, L. Stork-Sloots, F. de Snoo, M. Cristofanilli. "Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups." *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 154, č. 1, s. 81-8, 2015.
- [12] L. Esserman, C. Yau, C. K. Thompson, L. J. van 't Veer, A. D. Borowsky, K. A. Hoadley, N. P. Tobin, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, C. C. Benz and L. S. Lindström, "Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades," *JAMA Oncology*, no. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261, 2017.
- [13] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruner, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. van 't Veer; TRANSBIG Consortium. "The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study." *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 116, č. 2, s. 295-302, 2009.
- [14] L. J. van 't Veer, C. Yau, N. Y. Yu, C. C. Benz, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, L. J. Esserman, L. S. Lindström. "Tamoxifen therapy benefit for patients with 70-gene signature high and low risk." *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 166, č. 2, s. 593-601, 2017.
- [15] J. M. Bueno-de-Mesquita, W. H. van Harten, V. P. Retel, L. J. van 't Veer, F. S. van Dam, K. Karsenberg, K. F. Douma, H. van Tinteren, J. L. Peterse, J. Wesseling, T. S. Wu, D. Atsma, E. J. Rutgers, G. Brink, A. N. Floore, A. M. Glas, R. M. Roumen, F. E. Bellot, C. van Krimpen, S. Rodenhuis, M. J. van de Vijver, S. C. Linn. "Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER)." *Lancet Oncology*, vol. 8, č. 12, str. 1079-1087, 2007.
- [16] B. S. Wittner, D. C. Sgroi, P. D. Ryan, T. J. Bruinsma, A. M. Glas, A. Male, S. Dahiya, K. Habin, R. Bernards, D. A. Haber, L. J. van't Veer, S. Ramaswamy. "Analysis of the MammaPrint breast cancer

assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clinical Cancer Research*, vol. 14, č. 10, str. 2988-93, 2008.

- [17] L. J. Delahaye, D. Wehkamp, A. N. Floore, R. Bernards, L. J. van 't Veer and A. M. Glas, "Performance characteristics of the MammaPrint breast cancer diagnostic gene signature," *Personalized Medicine*, vol. 10, č. 8, s. 801-811, 2013.
- [18] A. Sapino, P. Roepman, S. C. Linn, M. H. Snel, L. J. Delahaye, J. van den Akker, A. M. Glas, I. M. Simon, N. Barth, F. A. de Snoo, L. J. van 't Veer, L. Molinaro, E. M. Berns and J. Wesseling, "MammaPrint Molecular Diagnostics on Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded Tissue," *The Journal of Mol. Diagnostics*, vol. 16, č. 2, s. 190 - 197, Březen 2014.
- [19] G. Viale, F. A. de Snoo, L. Slaets, J. Bogaerts, L. van 't Veer, E. J. Rutgers, M. J. Piccart-Gebhart, L. Stork-Sloots, A. Glas, L. Russo, P. Dell'Orto, K. Tryfonidis, S. Litière, F. Cardoso; MINDACT investigators. "Immunohistochemical versus molecular (BluePrint and MammaPrint) subtyping of breast carcinoma. Outcome results from the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT trial." *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 167, č. 1, s. 123-131, 2018.

Příloha A: Nukleotidové sekvence indexů MammaPrint Blueprint NGS 8bp

Tabulka 1: Nukleotidové sekvence indexů sady MammaPrint Blueprint A01 až H04

Index (souřadnice destičky)	Sekvence
A01	ATGCCTAA
B01	GAATCTGA
C01	AACGTGAT
D01	CACTTCGA
E01	GCCAAGAC
F01	GACTAGTA
G01	ATTGGCTC
H01	GATGAATC
A02	AGCAGGAA
B02	GAGCTGAA
C02	AAACATCG
D02	GAGTTAGC
E02	CGAACTTA
F02	GATAGACA
G02	AAGGACAC
H02	GACAGTGC
A03	ATCATTCC
B03	GCCACATA
C03	ACCACTGT
D03	CTGGCATA
E03	ACCTCCAA
F03	GCGAGTAA
G03	ACTATGCA
H03	CGGATTGC
A04	AACTCACC
B04	GCTAACGA
C04	CAGATCTG
D04	ATCCTGTA
E04	CTGTAGCC
F04	GCTCGGTA
G04	ACACGACC
H04	AGTCACTA

