

Příloha č. 1 – Specifikace Praktické studie k ověření vhodnosti implementace spektrální cytometrie do provozu komerční diagnostické laboratoře průtokové cytometrie

Formát a rozsah

Praktická studie bude zpracována v rozsahu **maximálně 20 normostran** čistého textu (1 NS = 1800 znaků včetně mezer) ve formátu **A4**. Grafické výstupy (grafy, tabulky, případně jiné vizualizace) budou do dokumentu zařazeny nad tento rozsah a do počtu NS se nezapočítávají. Dílo bude předáno v elektronické podobě (formát PDF).

Struktura a obsah praktické studie

a) Úvod a cíl studie

Tato část bude obsahovat představení problematiky studie a budou stručně shrnuty poznatky vyplývající z první části „STUDIE PRO POTENCIÁLNÍ IMPLEMENTACI CELOSPEKTRÁLNÍ CYTOMETRIE DO PROVOZU KOMERČNÍ DIAGNOSTICKÉ LABORATOŘE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE“.

Budou vytyčeny cíle, přičemž primární součástí praktické studie bude porovnání dat získaných na konvenčním osmibarevném cytometru BD Facs Canto II a spektrálním cytometru Cytek Aurora. Cílem je prokázat, jestli spektrální cytometr poskytuje výsledky srovnatelné kvality a může nahradit konvenční přístroj v diagnostických aplikacích, čímž dojde k efektivnějšímu využití vzorků, financí, a zjednodušení laboratorních procesů.

b) Metody, postupy a kvantifikace definovaných populací

V rámci uvedené části bude podrobně rozpracována metodika založená na níže uvedených postupech.

Vzorky budou zpracovány paralelně na obou přístrojích — BD Facs Canto II (konvenční osmibarevný cytometr) v laboratoři Objednatele a Cytek Aurora (spektrální cytometr) v laboratoři Zhotovitele, za použití navržených panelů pro detekci definovaných leukocytárních populací. Cílem je porovnat procentuální zastoupení a míru exprese vybraných markerů mezi oběma přístroji a ověřit robustnost a reprodukovatelnost výsledků. Tato část bude obsahovat shrnutí použitých postupů a metodologie, zejména pak:

- Postup standardizace a QC cytometru
- Použitý postup zpracování materiálu
- Detaily použitých panelů
- Detailní strategie analýzy jednotlivých populací a markerů (tzv. gating strategy)

Mezi analyzované parametry budou zařazeny T lymfocyty, NK buňky a plazmatické buňky, které jsou rutinně měřeny v obou laboratořích. T-lymfocyty a NK buňky byly zvoleny jako modelová populace pro svou dobrou životaschopnost, jasné definované subsety a časté zastoupení ve vzorcích periferní krve. Plazmatické buňky jsou citlivější a náchylnější než běžné lymfocyty, a proto jsou vhodné k hodnocení robustnosti měření a stability signálu.

Kromě procentuálního zastoupení populací se analýza zároveň zaměří na míru exprese terapeutických cílových molekul, které jsou využívány v imunoterapii hematologických malignit. Tyto markery umožní posoudit schopnost spektrální cytometrie přesně kvantifikovat expresi klinicky významných

terapeutických cílů, což má přímý dopad na možnosti diagnostického i výzkumného využití metody. Součástí analýzy bude podrobné porovnání hodnot Median Fluorescence Intensity (MFI), které představují klíčový ukazatel intenzity exprese markerů a tím i robustnosti měření mezi přístroji. Pro tento účel budou porovnány hodnoty MFI na plazmatických buňkách v duplicitních vzorcích získaných z obou cytometrů.

Analyzované parametry robustnosti, replikovatelnosti a porovnatelnosti:

1. Leukocyty
2. Lymfocyty
3. T-lymfocyty
 - Budou hodnocena procentuální zastoupení základních subsetů: CD4+ a CD8+ T buňky a jejich podskupiny (naive, central memory, effector memory, terminal effector memory).
 - K analýze budou použity markery CD3, CD4, CD8, CD27, CD45, CD197, CD45RA, případně další dle potřeby.
4. NK buňky (natural killer cells)
 - Budou sledovány hlavní subtypy NK buněk – CD16⁻ CD56^{high}, CD16⁺ CD56^{dim}, CD16⁺ CD56^{dim} CD57⁺.
 - K tomuto účelu budou použity markery CD3, CD16, CD45, CD56, CD57 a další podle potřeby, včetně funkčně relevantních molekul KIR2DL1, NKG2A.
 - U NK buněk bude kromě procentuálního zastoupení vyhodnocena i míra exprese vybraných funkčních molekul.
5. Plazmatické buňky
 - Tyto buňky představují klíčovou populaci u hematologických malignit (např. mnohočetný myelom, MGUS apod.) a jsou vhodným cílem pro hodnocení klinicky relevantních markerů.
 - Budou analyzovány pomocí markerů CD19, CD38, CD45, CD138, případně dalších podle potřeby.
 - Hodnocení míry exprese terapeutických cílů - CD38, BCMA, SLAMF7, FCRH5, CD229, GPRC5D, EZH2.

c) Výsledky

Tato část bude obsahovat:

- přehledně zpracované výstupy praktické studie (tabulky, grafy, případně jiné vizualizace),
- popis klíčových zjištění odpovídajících stanoveným cílům a otázkám,
- identifikaci trendů, rizik nebo příležitostí zjištěných v rámci analýzy.

Vzhledem k velikosti a objemu změřených dat, budou tato data převedena do rozsáhlé tabulkové podoby (hrubá data). Tabulková hrubá data budou vzhledem ke své komplexnosti finálně zpracována do přehledné tabulkové verze a následně do grafické podoby, které budou součástí studie, přehledně porovnávající mezi oběma přístroji následující primárně určené parametry pro hodnocení robustnosti, replikovatelnosti a porovnatelnosti metod:

- Procentuální zastoupení definovaných buněčných populací

- Porovnání intenzity signálů u vybraných markerů (MFI) na T lymfocytech i plazmatických buňkách
 - Přehledné srovnání hodnot mezi konvenčním a spektrálním cytometrem.
-

d) Diskuse a interpretace

Diskuse bude zaměřena na zhodnocení zjištěných rozdílů či shod mezi měřeními obou systémů (konvenční vs. spektrální). Budou vyhodnoceny definované parametry robustnosti, replikovatelnosti a porovnatelnosti dat, včetně statistického hodnocení (párový t-test nebo Wilcoxon). Součástí bude zhodnocení přínosu spektrální cytometrie pro rutinní diagnostickou praxi a popis možných omezení metody.

e) Závěr a doporučení

Závěrečná část shrne hlavní zjištění praktické studie, zejména:

- výsledky mezi konvenčním a spektrálním cytometrem
- zda spektrální cytometr poskytuje robustní a konzistentní výsledky vhodné pro klinickou diagnostiku,
- zda konsolidace stávajících osmibarevných panelů do jednoho spektrálního panelu je realizovatelná a efektivní a budou zdůrazněna negativa a pozitiva designu a měření spektrálních panelů.

Součástí budou také praktická doporučení pro implementaci spektrální cytometrie v rutinní praxi, návrhy na rozšíření panelů markerů a na integraci výsledků s dalšími diagnostickými metodami.

Další náležitosti

- Praktická studie bude zpracována v českém jazyce.
- Grafické zpracování (grafy, tabulky, obrázky) bude součástí hlavního textu vypracované analýzy a nebude započítáváno do celkového rozsahu 20 NS.
- Odevzdání proběhne v termínu stanoveném ve smlouvě.
- Zpracovatel zodpovídá za odbornou správnost a originalitu textu.