

Gebrauchsanleitung – BluePrint FFPE-Microarray

Einleitung

Der BluePrint-Test ist ein molekularer Subtypisierungs-Assay, der Brustkrebs in drei Subtypen aufteilt: Luminal-Typ, HER2-Typ und Basal-Typ. Dies erfolgt anhand von Genexpression auf der Grundlage des tatsächlichen biologischen Tumorprofils. Die molekulare Subtypisierung verbessert die Behandlungszuweisung, da Tumore auf der Grundlage histopathologischer Faktoren identisch erscheinen können, aber in Wirklichkeit sehr unterschiedliche klinische Ergebnisse aufweisen. ^(1,2,3)

Aus Proben von 200 Brustkrebspatientinnen und vier unabhängigen Validierungskohorten (n=748) wurde das 80-Gen-BluePrint-Profil erstellt. ⁽¹⁾ BluePrint unterscheidet zwischen drei intrinsischen Brustkrebssubtypen, dem Luminal-Typ, HER2-Typ und Basal-Typ. Diese intrinsischen Untergruppen werden anhand von Genexpressionspanels im Vergleich zur herkömmlichem IHC/FISH-Bewertung genauer identifiziert. ^(2,4)

Der BluePrint-Test analysiert das Expressionsprofil von 80 spezifischen Genen von Gewebeproben durch eine aus Brusttumorproben isolierte RNA-Analyse auf spezifischen Microarray-Glasträgern. Anhand eines proprietären Algorithmus bestimmt BluePrint den Korrelationsindex des 80-Gen-Profiles mit den drei einzelnen molekularen Subtypisierungszentroiden: Luminal-Typ, HER2-Typ und Basal-Typ.

Verwendungszweck

BluePrint FFPE ist ein qualitativer, nicht automatisierter und im Diagnoselabor von Agendia durchgeführter In-vitro-Diagnosetest. Dabei wird ein Genexpressionsprofil verwendet, das aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Brustkrebsgewebeproben (FFPE) gewonnen wird und zur Bestimmung des molekularen Subtyps dient.

BluePrint sagt die Größe des Nutzens einer systemischen Therapie voraus und kann bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen als Entscheidungshilfe dienen.

Die BluePrint-Gene messen die Eigenschaften der mehrstufigen Entwicklung von Brustkrebszellen zum Überleben, Vermehren, Ausbreiten und Metastasieren, die zu den krebspezifischen Merkmalen gerechnet werden. ⁽⁵⁾

Der Test wird für Brustkrebspatientinnen mit einer Erkrankung im Stadium I, Stadium II oder Stadium III durchgeführt. Die FFPE-Ergebnisse des BluePrint®-Tests sind von Ärzten zu verwenden und in Kombination mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren zu bewerten.

Zielgruppe

BluePrint FFPE-Microarray kann von Ärzten angefordert werden, die Brustkrebspatientinnen behandeln. Durch die Bestellung des BluePrint FFPE-Microarray-Tests fordert der Arzt bei Agendia die Durchführung des Tests anhand der bereitgestellten Probe im Diagnoselabor von Agendia an.

Testprinzip

Die Analyse beruht auf mehreren, nicht automatisierten Prozessen: Isolierung der RNA aus FFPE-Brustkrebsgewebeschnitten; Herstellung von cDNA durch Reverse Transcription der RNA; Amplifikation und

Markierung der cDNA; Hybridisierung der amplifizierten und markierten cDNA auf dem diagnostischen Microarray; Waschen und Scannen der diagnostischen Microarrays sowie Datenerhebung (Merkmalextraktion); Berechnung und Ermittlung des molekularen Subtyps (BluePrint).

Die BluePrint-Analyse ist dafür konzipiert, die Aktivität spezifischer Gene in einer Gewebeprobe zu ermitteln. Das Ergebnis ist ein Expressionsprofil, ein sogenannter „Fingerprint“ der Probe. Die Korrelation des Expressionsprofils mit den Templates (durchschnittliche mRNA-Expressionsniveaus von Luminal-, Basal- und HER2-Typ-Tumoren) wird berechnet (BluePrint-Index) und der molekulare Subtyp der Probe ermittelt (d. h. Basal-Typ, Luminal-Typ oder HER2-Typ).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Es muss eine korrekte Entsprechung der Patientenidentifikation auf dem Antragsformular und der Identifikation der Probe im LIMS-System vorliegen. Es wird eine interne Kennung erstellt, die der Probe im Laborverfahren korrekt zuzuweisen ist.

Auf der Testanfrage müssen die entsprechenden Informationen angegeben werden.

Die für den BluePrint-Test ausgewählte Probe muss den Kriterien der Zielpopulation entsprechen. Dazu zählen u. a. Brustkrebs bei Frauen, Frühstadium und eine Tumorzellularität von mindestens 30 %.

Die BluePrint-Ergebnisse sind von Ärzten als Ergänzung zu klassischen klinisch-pathologischen Faktoren zu verwenden. Der Test ist nicht für die Krankheitsprognostizierung konzipiert.

Verfahren

a) Auswahl der Patientinnen

Der Test ist für Patientinnen geeignet, bei denen Brustkrebs im Stadium I, II oder III diagnostiziert wurde.

b) Probenahme, Registrierung und Versand

Die Bedingungen für die Probenahme, Handhabung und Vorbereitung der Probe werden dem Kunden in der Gebrauchsanweisung vermittelt: MKT-067. Dieser Kit enthält Folgendes:

- 10 Mikroskop-Objektträger
- 2 Objektträgerhalter
- Kleiner und großer Druckverschlussbeutel aus Kunststoff
- Anweisung zur Probenahme
- Testanfrageformular
- Etikettenblatt mit Barcode-Etiketten
- Versandmaterial

Die Probenregistrierung wird durch eine Benachrichtigung des bestellenden Arztes initiiert. Diese Benachrichtigung (Testanfrageformular) kann online über das Kundenportal oder einen anderen Kommunikationskanal erfolgen. Agendia registriert alle entsprechenden Proben- und Patientendaten. Die Probe wird vom bestellenden Arzt bei Umgebungstemperatur und mit den zur Verfügung gestellten Kuriertmaterialien direkt an Agendias Diagnoselabor versandt.

c) Probeanalyse bei Agendia

Für FFPE-Gewebeprobe werden entweder die vom Kunden bereitgestellten Glasobjektträger mit FFPE-Gewebeschnitten verwendet oder aber die Objektträger werden mit einem gängigen Mikrotom aus dem vom Kunden bereitgestellten FFPE-Tumorblock erstellt. Die Gesamt-RNA wird mit einem handelsüblichen Isolierungs-Kit aus den Gewebeschnitten extrahiert. Die RNA-Probe wird aufgereinigt, amplifiziert und mit einem Cyanin-CTP / dUTP fluoreszierenden Farbstoff markiert.

Die RNA/cDNA-Probe wird auf einem speziell entworfenen diagnostischen Microarray hybridisiert (8er-Packung, Agilent Technologies).

Ein Microarray-Scanner von Agilent wird zum Scannen des diagnostischen Microarrays verwendet. Das Ergebnis ist eine Scan-Datei (TIFF). Diese Datei wird von der Agilent Feature Extraction Software verwendet. Die Feature Extraction Software analysiert die Scan-Datei (TIFF), indem sie die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Merkmale im Vergleich zur diagnostischen Microarray Chip-Design-Datei als Template ermittelt, um Kontrollmerkmale, Normalisierungsmerkmale und Reportermerkmale zu identifizieren. Die Fluoreszenzintensität der Merkmale ist ein Maß für die Expression bestimmter Gene.

d) Datenanalyse und Berichterstattung

Die Datenanalyse wird nach einem spezifischen BluePrint-Algorithmus durchgeführt, der den BluePrint-Index berechnet und den molekularen Subtyp der Probe ermittelt (Basal-Typ, Luminal-Typ oder HER2-Typ).

Es werden umfassende Qualitätskontrollen (> 25) durchgeführt, um ein korrektes Analyseergebnis zu gewährleisten. Die Qualitätskontrollen werden zusammen mit dem Ergebnis übermittelt und intern vom Laborleiter genehmigt.

e) Berichterstattung

Der bestellende Arzt erhält einen Patientenbericht sowie eine Ergebniszusammenfassung für jeden bestellten BluePrint FFPE-Microarray-Test. Wir verweisen in Bezug auf die personengebundenen Daten der Patientinnen auf unsere Datenverarbeitungsbedingungen in der Datenschutzrichtlinie von Agendia.

Einschränkungen des Verfahrens

BluePrint wurde ausschließlich für die Verwendung mit weiblichem Brustkrebstumorgewebe validiert. Tests mit anderen Probentypen können zu fehlerhaften oder fehlenden Ergebnissen führen. Zuverlässige Ergebnisse sind von geeigneten Probenentnahmen und Transportverfahren abhängig.

BluePrint wurde speziell für Tumore validiert, bei denen es sich um invasive duktales oder lobuläre Karzinome handelt. Die Testung anderer Probentypen (z. B. aus den Lymphknoten) wurde nicht evaluiert.

Zu erwartende Werte

Der BluePrint FFPE-Test teilt Brustkrebsgewebeprobe in drei unterschiedliche Subtypen ein: Luminal-Typ, HER2-Typ und Basal-Typ. Der Subtyp mit dem höchsten Indexwert bestimmt den molekularen Subtyp des Tumors.

Luminal-Typ

Brustkrebsarten vom Luminal-Typ zeichnen sich durch die Genexpression der luminalen Epithelzellen aus, welche die Milchgänge und Brustdrüsen bedecken.

HER2-Typ

Brustkrebsarten des HER2-Typs zeichnen sich durch die Amplifikation oder Überexpression des HER2-Lokus aus. Bei den HER2-Typ-Krebsarten handelt es sich im Regelfall um HER2-positive Tumoren nach IHC oder FISH (HER2/neu-positiv). Ergibt der Blueprint-Test einen HER2-Typ, bedeutet das, dass der Tumorphenotyp dem intrinsischen Subtyp des HER2-Typs am ehesten entspricht.

Basal-Typ

Brustkrebsarten des Basal-Typs zeichnen sich durch die Genexpression der Ursprungsbasal-/Myoepithelzellen aus. Die Krebsarten des Basal-Typs sind im Regelfall dreifach negativ für ER, PR und HER2 und weisen ein spezifisches Genexpressionsprofil auf.

Ergibt der Blueprint-Test einen Basal-Typ, bedeutet das, dass der Tumorphenotyp dem intrinsischen Subtyp des Basal-Typs am ehesten entspricht.

Leistungsmerkmale

Die für Blueprint untersuchten Leistungsmerkmale sind: Präzision und Reproduzierbarkeit, Messbereich, analytische Spezifität und Nachweisgrenze.

Analytische Leistung

Die Konkordanz der Ergebnisse von Frisch- und FFPE-Gewebe wurde in zwei Studien mit 97 % (n=413) bzw. 90 % (n=55) bewertet, wobei keine Verzerrung der Blueprint-Ergebnisse zwischen Gewebetypen festgestellt wurde.

Blueprint zeigt sich auch im Zeitverlauf mit einer Reproduzierbarkeit zwischen 97,6 % und 98,9 % stabil und zwischen verschiedenen Isolierungen desselben Gewebes reproduzierbar, wobei kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Subtyp (Q-Test nach Cochran $p=1,0$) und Indizes (ANOVA Luminal $p=0,850$, HER2 $p=0,725$ und Basal $p=0,400$) festgestellt wurde. Die Reproduzierbarkeit von Blueprint zwischen verschiedenen Standorten lag bei 100 % und zwischen verschiedenen Scannern ebenfalls bei 100 %. Darüber hinaus wurden eine hohe Präzision (98,6 %) und Wiederholbarkeit (99 %) festgestellt (6).

Darüber hinaus wurde für das FG-Array kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der wiederholten RNA-Isolierungen, der Präzision (Luminal 98,98 %, HER2 98,87 %, Basal 98,84 %), der Reproduzierbarkeit (Luminal 98,71 %, HER2 98,43 %, Basal 98,24 %) und der Wiederholbarkeit (Luminal 99,08 %, HER2 99,03 %, Basal 98,96 %) festgestellt, und die Übereinstimmung zwischen den 8pack- und FG-Array-Ergebnissen zweier separater Datensätze betrug 98,91 % (n = 92) und 99,86 % (n = 698).

Der Messbereich des Blueprint-FFPE-Index ist die Korrelation des Expressionsprofils mit den Templates (durchschnittliche mRNA-Expressionsniveaus von Luminal-, Basal- und HER2-Typ-Tumoren). Der molekulare Subtyp der Probe wird dann von der mit dem höchsten Blueprint-Index bestimmt.

Es wurde eine Interferenzstudie mit dem Vollgenom-Array (FG-Array) durchgeführt, um festzustellen, ob vier relevante Substanzen die Blueprint-FFPE-Ergebnisse beeinträchtigen. Die Ergebnisse zeigten, dass DNA-Kontaminationen bis zum 2,5-fachen des Hintergrundniveaus und Proteinspitzen während der RNA-Isolierung sowie Ethanol- und AMPure-XP-Beads-Überträge während der cDNA-Aufreinigung die Blueprint-Ergebnisse nicht beeinträchtigten. Insgesamt haben störende Gewebestandteile keinen Einfluss auf das Blueprint-Ergebnis, da die ursprüngliche Tumorerie repräsentativ für Brustkrebsproben war und auch hier die anderen Gewebestandteile zufällig verteilt waren und nicht mit einem Krankheitsausgang in Verbindung standen⁽¹⁾.

Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden die BluePrint-FFPE-Ergebnisse über die verschiedenen Verdünnungen hinweg verglichen, wobei sich sehr stabile Ergebnisse selbst bei sehr geringen cDNA-Mengen auf dem Array ergaben. Auf der Grundlage der Ergebnisse liegt die Nachweisgrenze für den cDNA-Input bei 900 ng. Darüber hinaus wurde die Nachweisgrenze für den RNA-Input gemäß einer separaten Studie auf 19,98 ng festgesetzt.

Test bestellen

Von Ihrer Kontaktperson bei Agendia erhalten Sie einen Probenentnahme-Kit. Tragen Sie die Tumorprobe mithilfe des Kits gemäß den Anweisungen auf die Objektträger auf oder fertigen Sie einen FFPE-Block an. Geben Sie Ihre Bestellung über unser Online-Portal auf oder füllen Sie das Testanforderungsformular aus, das Sie im Entnahme-Kit finden. Weitere Angaben finden Sie in der Kit-Gebrauchsanweisung.

Wenn Sie zusätzliche Unterstützung oder Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an Customerservice@agendia.com oder +31 (0)20 462 1510.

Quellenangaben

1. Krijgsman et al. Breast Cancer Res Treat 2011, 133(1): 37-47
2. Glück et al. Breast Cancer Res Treat 2013, 139(3): 759-767
3. Whitworth et al. Ann Surg Oncol 2017, 24(3): 669-675
4. Beitsch et al. Ann Surg Oncol 2017, 24(9): 2539-2546
5. Haan et. al. Genes Chromosomes Cancer 2021; (61):148-160
6. Mittempergher et al. Transl Oncol 2020, 13(4): 100756

Hinweis:

Bitte melden Sie ernste Störfälle im Zusammenhang mit BluePrint FFPE dem Hersteller und der zuständigen Instanz des Mitgliedstaats. Der Hersteller meldet die ernstesten Störfälle der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Benutzer/Patient ansässig ist.

Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Akkreditierungszertifikate: Agendia, Inc.:
05D1089250

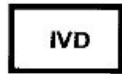
Fertigungsdaten



Agendia NV
Radarweg 60
1043 NT Amsterdam, Niederlande
Telefon: +31 (0)20 462 1510
E-Mail: customerservice@agendia.com

Agendia Diagnoselabor, Adresse Agendia, Inc.:
22 Morgan,
Irvine, CA 92618, USA
Tel.: +1 888 321 2732 Fax:
+1 866 756 7548
www.agendia.com

Basis-UDI-DI: 0850024841BlueprintBB



© 2021 Agendia NV. Alle Rechte vorbehalten. Agendia, das Agendia-Logo und BluePrint sind eingetragene Marken von Agendia NV.

MKT-518-2

Ausgabedatum: Februar 2025

Änderungen bezüglich Vorgängerversion

Version 2 – Aktualisierung des Verwendungszwecks, des Referenzteils, der Leistungsmerkmale, Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Erstveröffentlichung – November 2022