

BluePrint FFPE in microarray - Istruzioni per l'uso

Introduzione

Il test BluePrint è un test di sottotipizzazione molecolare che consente di classificare il carcinoma mammario in tre sottotipi distinti (di tipo luminale, HER2 o basale) basandosi sul profilo biologico reale del tumore utilizzando l'espressione genica. La sottotipizzazione molecolare migliora l'allocatione del trattamento, poiché i tumori in apparenza identici in base alle caratteristiche istopatologiche possono infatti avere esiti clinici molto diversi. ^(1,2,3)

Utilizzando 200 campioni originali provenienti da pazienti affetti da carcinoma mammario e quattro coorti di validazione indipendenti (n=748), è stato stabilito un profilo BluePrint di 80 geni. ⁽¹⁾ BluePrint opera una distinzione tra i tre sottotipi di carcinoma mammario intrinseco (tipo luminale, HER2 e basale). Questi sottogruppi intrinseci vengono individuati in modo più accurato utilizzando dei pannelli di espressione genica rispetto alla valutazione IHC/FISH standard. ^(2,4)

Il test BluePrint analizza il profilo di espressione di 80 geni specifici in un campione di tessuto utilizzando l'RNA isolato da campioni di tessuto tumorale su vetrini microarray personalizzati. Utilizzando un algoritmo proprietario, BluePrint determina l'indice di correlazione del profilo di 80 geni con ciascuno dei tre distinti centroidi di sottotipizzazione molecolare, ovvero il tipo luminale, HER2 e basale.

Destinazione d'uso

BluePrint FFPE è un test diagnostico in vitro qualitativo non automatizzato effettuato presso il Laboratorio per i servizi diagnostici di Agendia utilizzando il profilo di espressione genica ottenuto da campioni di tessuto di carcinoma mammario fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) per determinare il sottotipo molecolare.

BluePrint è in grado di prevedere l'entità del beneficio della terapia sistemica per orientare le decisioni terapeutiche per le pazienti affette da carcinoma mammario.

I geni BluePrint misurano le caratteristiche di sviluppo cellulare del carcinoma mammario nelle sue molteplici fasi (sopravvivenza, proliferazione, diffusione e metastasi), come è stato scoperto nei segni distintivi del cancro⁽⁵⁾.

Il test viene effettuato su pazienti affette da carcinoma mammario al primo, secondo o terzo stadio. L'esito del test BluePrint[®] FFPE è indicato per l'uso da parte del personale medico e dovrebbe essere interpretato insieme ad altri fattori clinico-patologici.

A chi è destinato

Il BluePrint FFPE in microarray deve essere richiesto dal medico curante della paziente affetta da carcinoma mammario. Ordinando il test BluePrint FFPE in microarray, il professionista sanitario richiederà ad Agendia di effettuare il test su un campione presso il Laboratorio per i servizi diagnostici di Agendia.

Principio del test

L'analisi si basa su vari processi non automatizzati: isolamento dell'RNA da sezioni di tessuto di carcinoma mammario FFPE, retrotrascrizione dell'RNA risultante in cDNA, amplificazione e marcatura del cDNA, ibridazione

del cDNA amplificato e marcato in microarray diagnostico, lavaggio e scansione del microarray diagnostico e acquisizione dati (estrazione delle caratteristiche), calcolo e determinazione del sottotipo molecolare (BluePrint).

L'analisi BluePrint è stata appositamente studiata per stabilire l'attività di determinati geni in un campione di tessuto. Il risultato è un profilo di espressione o "impronta digitale" del campione. Viene calcolata la correlazione del profilo di espressione con i template (i livelli medi di espressione dell'mRNA dei tumori di tipo luminale, basale e HER2) (indice BluePrint) e viene determinato il sottotipo molecolare del campione (es. tipo basale, luminale, HER2).

Avvertenze e precauzioni

L'identificativo della paziente riportato nel modulo di richiesta dovrà corrispondere esattamente all'identificativo riportato sul campione all'interno del sistema LIMS, che genera un identificativo interno da abbinare correttamente al campione nella procedura di laboratorio.

Si prega di inserire nel modulo di richiesta di effettuazione del test tutte le informazioni rilevanti.

Il campione selezionato per il test BluePrint dovrà corrispondere ai criteri previsti per la popolazione target come ad esempio carcinoma mammario, stadio iniziale e contenuto di cellule tumorali di almeno il 30%.

L'esito del test BluePrint può essere utilizzato dai medici insieme a fattori clinico-patologici standard. Lo scopo del test non è quello di determinare l'esito della malattia.

Procedura

a) Selezione delle pazienti

Le pazienti sono selezionabili se le è stato loro diagnosticato un carcinoma mammario in stadio I, II o III.

b) Raccolta, registrazione e spedizione del campione.

Le condizioni a cui sono subordinate la raccolta, la manipolazione e la preparazione del campione sono riportate nelle istruzioni per l'uso MKT-067. Questo kit include:

- 10 vetrini microscopici
- 2 portavetrini per cinque vetrini
- Una sacca di plastica con cerniera piccola e una grande
- Istruzioni per il prelievo dei campioni
- Modulo di richiesta di effettuazione del test
- Foglio con etichette provviste di codice a barre
- Materiale di spedizione

La registrazione del campione inizia con la notifica da parte del professionista sanitario committente. Questa notifica (Modulo di richiesta di effettuazione del test) può avvenire tramite il portale clienti online o un altro canale di comunicazione. Agendia registra tutte le informazioni relative al campione e alla paziente. Il campione dovrà essere spedito direttamente al Laboratorio per i servizi diagnostici di Agendia dal professionista sanitario committente a temperatura ambiente utilizzando il materiale di trasporto fornito.

c) Analisi dei campioni da parte di Agendia

Per i campioni di tessuto FFPE vengono utilizzati vetrini in vetro forniti dal committente con sezioni di tessuto FFPE oppure vengono realizzati dei vetrini dal blocco tumorale FFPE fornito dal cliente utilizzando un microtomo standard. L'RNA totale viene estratto dalle sezioni di tessuto utilizzando un kit di isolamento normalmente disponibile in commercio. Il campione di RNA viene purificato, amplificato ed etichettato con un colorante fluorescente cianina-CTP/dUTP.

Il campione di RNA/cDNA viene ibridato su un microarray diagnostico appositamente studiato (confezione da 8, Agilent Technologies).

Utilizzando uno scanner per microarray Agilent, si effettua la scansione del microarray diagnostico e il risultato è un file di scansione (TIFF) che verrà utilizzato dal software Agilent Feature Extraction. Il software di estrazione delle caratteristiche analizza il file di scansione (TIFF) determinando le intensità di fluorescenza relative delle singole caratteristiche rispetto al file di progettazione del chip di microarray diagnostico come modello per individuare le caratteristiche di controllo, le caratteristiche di normalizzazione e le caratteristiche del gene reporter. Le intensità di fluorescenza delle caratteristiche sono una misura per l'espressione di determinati geni.

d) Analisi dei dati e rendicontazione

L'analisi dei dati viene eseguita secondo uno specifico algoritmo BluePrint che calcola gli indici BluePrint determinando il sottotipo molecolare del campione (tipo basale, luminale o HER2).

Vengono attuati controlli di qualità estesi (>25) al fine di garantire un corretto risultato analitico. I CQ unitamente all'esito vengono rendicontati e approvati internamente dal Responsabile di Laboratorio.

e) Rendicontazione

Il professionista sanitario committente riceve un referto e un riepilogo dei risultati per ciascun test BluePrint FFPE in microarray ordinato. Relativamente ai dati personali delle pazienti, si rimanda alle condizioni inerenti al trattamento dei dati riportate nell'Informativa sulla privacy di Agendia.

Limiti della procedura

L'utilizzo di BluePrint è stato validato esclusivamente con tessuto di carcinoma mammario. L'analisi di altri tipi di campioni può produrre risultati errati o nessun risultato. Un esito affidabile dipende da procedure adeguate di raccolta e trasporto dei campioni.

BluePrint è stato specificamente validato per i carcinomi duttali invasivi o i carcinomi lobulari. Non sono stati valutati test su altri tipi di campioni (ad es. linfonodi).

Valori previsti

Il test BluePrint FFPE consente di classificare i campioni di tessuto di carcinoma mammario in tre sottotipi distinti, ovvero il tipo luminale, HER2 e basale. Il sottotipo con l'indice più elevato determina il sottotipo molecolare del tumore.

Tipo luminale

I carcinomi mammari di tipo luminale sono caratterizzati dall'espressione genica delle cellule epiteliali luminali che rivestono i dotti e le ghiandole mammarie.

Tipo HER2

I carcinomi mammari di tipo HER2 sono caratterizzati da un'amplificazione o una sovraespressione del locus HER2. I carcinomi mammari di tipo HER2 sono tipicamente tumori HER2-positivi per IHC o FISH (HER2/neu positivi). Un esito Blueprint di tipo HER2 significa che il fenotipo del tumore è più simile al sottotipo intrinseco di tipo HER2.

Tipo basale

I carcinomi mammari di tipo basale sono caratterizzati dall'espressione genica delle cellule basali/mioepiteliali originarie. I tumori di tipo basale sono tipicamente triplo-negativi per ER, PR e HER2 con uno specifico profilo di espressione genica.

Un esito Blueprint di tipo basale significa che il fenotipo del tumore assomiglia maggiormente al sottotipo intrinseco di tipo basale.

Caratteristiche di prestazione

Tra le caratteristiche in termini di prestazioni analizzate per Blueprint figurano l'accuratezza e la riproducibilità, l'intervallo segnalabile, la specificità analitica ed il limite di rilevamento.

Performance analitica

La concordanza dei risultati ottenuti sui campioni di tessuto freschi e FFPE è stata valutata in due studi in cui è risultata essere pari al 97% (n= 413) ed al 90% (n= 55), senza bias nei risultati Blueprint tra i tipi di tessuto. Blueprint è inoltre risultato essere stabile nel tempo con una riproducibilità compresa tra il 97,6% e il 98,9% e riproducibile tra isolamenti differenti dello stesso tessuto e non sono state osservate differenze significative nel sottotipo (test Q di Cochran, p= 1,0) e negli indici (ANOVA Luminale p= 0,850, HER2 p= 0,725 e Basale p= 0,400). La riproducibilità del Blueprint tra punti differenti è stata del 100%, mentre quella tra scanner differenti del 100%. Sono inoltre state riscontrate un'accuratezza (98,6%) ed una ripetibilità (99%) elevate (6). Inoltre, per l'FG-array, non è stata riscontrata alcuna differenza tra i risultati di isolamenti ripetuti di RNA in termini di accuratezza (98,98%, 98,87% e 98,84% rispettivamente per il luminale, HER2 e il basale), riproducibilità (98,71%, 98,43%, e 98,24% rispettivamente per il luminale, HER2 e il basale) e ripetibilità (99,08%, 99,03% e 98,6% rispettivamente per il luminale, HER2 ed il basale). La concordanza tra i risultati 8pack e FG-array con due set di dati separati è risultata essere pari al 98,91% (n= 92) e 99,86% (n= 698).

L'intervallo segnalabile dell'indice Blueprint FFPE è la correlazione del profilo di espressione con i template (i livelli medi di espressione dell'mRNA dei tumori di tipo luminale, basale ed HER2). Il sottotipo molecolare del campione è stato pertanto determinato da quello con l'indice Blueprint più alto.

È stato condotto uno studio delle interferenze sull'array a genoma completo (FG-array) per valutare se quattro sostanze rilevanti possono interferire con i risultati del Blueprint FFPE. I risultati hanno dimostrato che la contaminazione del DNA fino a 2,5 volte i livelli di fondo e i picchi proteici durante l'isolamento dell'RNA, nonché il carryover di etanolo e di microsferi di AMPure XP durante la purificazione del cDNA non hanno avuto alcun impatto sui risultati del Blueprint. Nel complesso, i componenti tissutali interferenti non influenzano il risultato del Blueprint poiché le serie tumorali originali sono rappresentative dei campioni di carcinoma mammario e anche in questo caso gli altri componenti tissutali erano distribuiti in modo casuale e non erano correlati ad un esito della malattia⁽¹⁾.

Per valutare il limite di rilevamento, i risultati del Blueprint FFPE sono stati confrontati con varie diluizioni ed hanno mostrato risultati molto stabili anche con input molto bassi di cDNA nell'array. In base ai risultati ottenuti, il limite di rilevamento per l'input di cDNA è di 900 ng. Inoltre, il LoD per l'input di RNA derivato da uno studio separato è risultato essere pari a 19,98 ng.

Ordinazione del test

Il suo referente di Agendia provvederà a fornirle un kit per la raccolta dei campioni. Utilizzando il kit, dovrà aggiungere il campione tumorale ai vetrini seguendo le istruzioni o preparare un blocco FFPE. Effettui l'ordine sul nostro portale online o compilando il modulo di richiesta di effettuazione del test che troverà nel kit di raccolta di campioni. Troverà maggiori informazioni nelle istruzioni per l'uso di questo kit.

Per ulteriore assistenza, la invitiamo a contattarci all'indirizzo e-mail customerservice@agendia.com o a telefonare al numero +31 (0)20 462 1510.

Bibliografia

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

Avvertenza:

si prega di segnalare qualsiasi incidente grave relativo a Blueprint FFPE al costruttore e alle autorità competenti dello Stato membro. Il costruttore provvederà a segnalare eventuali incidenti gravi occorsi alle autorità competenti dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore o la paziente.

Clinical Laboratory Improvement Amendments

(CLIA) Certificati di accreditamento: Agendia, Inc.:
05D1089250

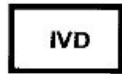
Dati relativi al costruttore



Agendia NV
Radarweg 60
1043 NT Amsterdam, Paesi Bassi
Tel.: +31 (0)20 462 1510
e-mail: customerservice@agendia.com

Indirizzo del laboratorio per i servizi diagnostici di
Agendia, Inc.:
22 Morgan,
Irvine, CA 92618, USA
Tel.: +1 888 321 2732 Fax:
+1 866 756 7548
www.agendia.com

UDI-DI di base: 0850024841BlueprintBB



© 2021 Agendia, NV. Tutti i diritti riservati. Agendia, il logo Agendia e BluePrint sono marchi registrati di Agendia, NV.

MKT-518-2

Data di pubblicazione: Febbraio 2025

Modifiche della versione precedente

Versione 2: aggiornamento della destinazione d'uso, della sezione dei riferimenti bibliografici, delle caratteristiche delle performance, delle avvertenze e delle precauzioni.

Prima pubblicazione: novembre 2022