

## Návod na použitie – Mikročip Blueprint FFPE

### Úvod

Test Blueprint je test určený na molekulárnu subtypizáciu, ktorý následne klasifikuje rakovinu prsníka do troch odlišných podtypov: Luminálny typ, typ HER2 a bazálny typ na základe skutočného biologického profilu nádoru prostredníctvom génovej expresie. Molekulárna subtypizácia zlepšuje alokáciu liečby, pretože nádory, ktoré sa môžu zdať identické na základe histopatologických znakov, môžu mať v skutočnosti veľmi odlišné klinické výsledky. <sup>(1,2,3)</sup>

Použitím 200 počiatočných vzoriek pacientov s rakovinou prsníka a štyroch nezávislých validačných kohort (n=748) sa stanovil 80-génový profil Blueprint. <sup>(1)</sup> Blueprint rozlišuje celkovo tri podtypy rakoviny prsníka; luminálny typ, typ HER2 a bazálny typ. Tieto vnútorné podskupiny sú presnejšie identifikované pomocou panelov génovej expresie v porovnaní so štandardným hodnotením IHC/FISH. <sup>(2,4)</sup>

Test Blueprint analyzuje profil expresie 80 špecifických génov vo vzorke tkaniva spustením izolovanej RNA zo vzoriek nádorového tkaniva na vlastných sklenených mikročipoch. Pomocou vlastného algoritmu Blueprint určuje korelačný index profilu 80 génov s každým z troch rôznych ťažísk molekulárnej subtypizácie: Luminálny typ, typ HER2 a bazálny typ.

### Zamýšľané použitie

Blueprint FFPE je kvalitatívny, neautomatizovaný diagnostický test in vitro, ktorý sa vykonáva v laboratóriu diagnostických služieb spoločnosti Agendia a využíva profil génovej expresie získaný zo vzoriek tkaniva rakoviny prsníka fixovaných vo formalíne a zaliatých parafínom (FFPE) na určenie molekulárneho podtypu rakoviny prsníka.

Blueprint predpovedá veľkosť prínosu systémovej liečby na usmernenie rozhodnutí o liečbe u pacientok s karcinómom prsníka.

Gény Blueprint merajú charakteristiky viacstupňového vývoja buniek rakoviny prsníka, ktoré prežívajú, množia sa, šíria sa a metastazujú, ako sa uvádza v rámci charakteristických znakov rakoviny<sup>(5)</sup>.

Test sa vykonáva u žien s rakovinou prsníka v štádiu I, v štádiu II alebo v štádiu III. Výsledok Blueprint® FFPE je indikovaný na použitie lekármi a má sa interpretovať spolu s ďalšími klinicko-patologickými faktormi.

### **Pre koho je test určený**

Mikročip Blueprint FFPE je určený na vyžiadanie ošetrojúcim zdravotníckym pracovníkom pacientky s rakovinou prsníka. Objednaním mikročipového testu Blueprint FFPE poskytovateľ zdravotnej starostlivosti požiada spoločnosť Agendia o vykonanie testu na vzorke v laboratóriu diagnostických služieb spoločnosti Agendia.

### **Princíp fungovania testu**

Analýza je založená na niekoľkých neautomatizovaných procesoch: izolácia RNA z tkanivových rezov rakoviny prsníka FFPE; reverzná transkripcia RNA vedúca k cDNA; amplifikácia a značenie cDNA; hybridizácia amplifikovanej a značenej cDNA s diagnostickým mikročipom; umývanie a skenovanie diagnostického mikročipu a získavanie údajov (výber charakteristických znakov); výpočet a určenie molekulárneho podtypu (Blueprint).

Analýza BluePrint je navrhnutá na určenie aktivity špecifických génov vo vzorke tkaniva. Výsledkom je profil expresie alebo „odtlačok prsta“ vzorky. Vypočíta sa korelácia profilu expresie so šablónami (priemerné hladiny expresie mRNA nádorov luminálneho, bazálneho typu a typu HER2) (index BluePrint) a určí sa molekulárny podtyp vzorky (t. j. bazálny typ, luminálny typ, typ HER2).

### ***Upozornenia a bezpečnostné opatrenia***

---

Identifikácia pacienta vo formulári žiadosti sa musí správne zhodovať s identifikáciou vzorky v systéme LIMS, čím sa vytvorí interný identifikátor, ktorý by sa mal správne priradiť ku vzorke v rámci laboratórneho procesu.

Vyplňte formulár žiadosti o test s príslušnými informáciami

Vzorka vybraná na testovanie prostredníctvom BluePrint by mala zodpovedať kritériám určenej populácie, ako je napríklad - nie však výlučne - rakovina prsníka u žien, včasné štádium, obsah nádorových buniek najmenej 30 %.

Výsledky BluePrint sú okrem štandardných klinicko-patologických faktorov indikované na použitie lekárom. Test nie je určený na stanovenie výsledku ochorenia.

### ***Postup***

---

#### ***a) Výber pacientok***

Pacientky sú vhodné, ak im bola diagnostikovaná rakovina prsníka v štádiu I, II alebo III.

#### ***b) Odber, registrácia a odosielanie vzoriek.***

Podmienky odberu, manipulácie a prípravy vzorky sú zákazníkovi poskytnuté prostredníctvom návodu na použitie: MKT-067. Táto súprava obsahuje nasledovné:

- 10 Podložných sklíčok
- 2 Nosiče s piatimi sklíčkami
- Malú a veľkú plastovú tašku na zips
- Pokyny na odber vzoriek
- Formulár žiadosti o test
- Etiketový hárok so štítkami a čiarovými kódmi
- Prepravné materiály

Registrácia vzorky sa iniciuje oznámením od objednávajúceho poskytovateľa zdravotnej starostlivosti. Toto oznámenie (formulár žiadosti o test) sa môže uskutočniť prostredníctvom online zákaznickeho portálu alebo iného komunikačného kanála. Spoločnosť Agendia registruje všetky súvisiace informácie o vzorke a pacientovi. Vzorka je odoslaná priamo do laboratória diagnostických služieb spoločnosti Agendia objednávajúcim poskytovateľom zdravotnej starostlivosti pri teplote okolia pomocou poskytnutých kuriérskych prepravných materiálov.

#### ***c) Analýza vzorky v spoločnosti Agendia***

Pre vzorky tkaniva FFPE sa používajú sklenené podložné sklíčka s tkanivovými rezmi FFPE poskytnuté zákazníkovi alebo sa sklíčka vyrábajú z bloku nádoru FFPE poskytnutého zákazníkovi pomocou štandardného mikrotómu. Celková RNA sa extrahuje z tkanivových rezov pomocou štandardnej komerčne dostupnej izolačnej súpravy. Vzorka RNA sa prečistí, amplifikuje a označí fluorescenčným farbivom cyanín-CTP/dUTP.

Vzorka RNA/cDNA sa hybridizuje na špecificky navrhnutom diagnostickom mikročipe (balenie po 8 kusoch, Agilent Technologies).

Na skenovanie diagnostického mikročipu sa používa skener Agilent a výsledkom je súbor skenu (TIFF). Tento súbor využíva softvér na extrakciu funkcií spoločnosti Agilent. Softvér určený na extrakciu funkcií analyzuje súbor skenu (TIFF) určením relatívnej intenzity fluorescence jednotlivých prvkov oproti súboru návrhu diagnostického mikročipu ako šablóny s cieľom identifikovať kontrolné prvky, normalizačné prvky a prvky reportérového génu. Intenzita fluorescence prvkov je mierou pre expresiu konkrétnych génov.

#### **d) Analýza údajov a hlásenie**

Analýza údajov sa vykonáva podľa špecifického algoritmu BluePrint, ktorý vypočítava indexy BluePrint a určuje molekulárny podtyp vzorky (bazálny typ, luminálny typ alebo typ HER2).

Zavádzajú sa rozsiahle kontroly kvality (> 25), aby sa zabezpečil správny analytický výsledok. Kontroly kvality spolu s výsledkom hlási a interne schvaľuje riaditeľ laboratória.

#### **e) Hlásenie**

Objednávajúci poskytovateľ zdravotnej starostlivosti dostane správu o pacientovi, ako aj súhrn výsledkov pre každý objednaný mikročipový test BluePrint FFPE. Pokiaľ ide o osobné údaje pacientov, pozrite si naše podmienky spracovania údajov v Zásadách ochrany osobných údajov spoločnosti Agendia.

#### **Obmedzenia postupu**

---

BluePrint bol schválený na použitie len s nádorovým tkanivom rakoviny prsníka u žien. Testovanie iných typov vzoriek môže viesť k nesprávnym alebo žiadnym výsledkom. Spoľahlivé výsledky závisia od adekvátnych postupov odberu a prepravy vzoriek.

BluePrint bol špeciálne schválený pre nádory, ktoré sú invazívnym duktálnym karcinómom alebo lobulárnym karcinómom. Testovanie iných typov vzoriek (napr. lymfatických uzlín) nebolo hodnotené.

#### **Očakávané hodnoty**

---

Test BluePrint FFPE klasifikuje vzorky tkaniva rakoviny prsníka do troch odlišných podtypov: Luminálny typ, typ HER2 a bazálny typ. Podtyp s najvyšším indexovým skóre určuje molekulárny podtyp nádoru.

##### *Luminálny typ*

Rakoviny prsníka luminálneho typu sú charakterizované génovou expresiou luminálnych epiteliálnych buniek, ktoré lemujú prsné kanáliky a žľazy.

##### *Typ HER2*

Rakoviny prsníka typu HER2 sú charakterizované amplifikáciou alebo nadmernou expresiou lokusu HER2. Rakoviny typu HER2 sú typicky HER2-pozitívne nádory podľa IHC alebo FISH (HER2/neu pozitívne). Výsledok BluePrint typu HER2 znamená, že fenotyp nádoru sa najviac podobá vnútornému podtypu typu HER2.

### *Bazálny typ*

Rakoviny prsníka bazálneho typu sú charakterizované génovou expresiou pôvodných bazálnych/myoepiteliálnych buniek. Rakoviny bazálneho typu sú typicky trojnásobne negatívne na ER, PR a HER2 so špecifickým profilom gébovej expzie.

Výsledok BluePrint bazálneho typu znamená, že fenotyp nádoru sa najviac podobá vnútornému podtypu bazálneho typu.

### **Výkonnostná charakteristika**

---

Výkonnostné charakteristiky skúmané pre BluePrint zahŕňajú: precíznosť a reprodukovateľnosť, hlásiteľný rozsah, analytickú špecifickosť a hranicu detekcie.

#### Analytický výkon

Zhoda výsledkov z čerstvých tkanív a tkanív FFPE sa hodnotila v dvoch štúdiách, v ktorých sa zistilo, že je 97 % (n = 413) a 90 % (n = 55), pričom medzi oboma typmi tkanív nedochádza k skresleniu výsledkov BluePrint.

Test BluePrint je tiež stabilný v čase s reprodukovateľnosťou medzi 97,6 % a 98,9 % a je reprodukovateľný medzi rôznymi izoláciami toho istého tkaniva, kde sa nepozoroval žiadny významný rozdiel v podtype (Cochranov Q-test, p = 1,0) a indexoch (ANOVA luminálny typ p = 0,850, typ HER2 p = 0,725 a bazálny typ p = 0,400). Reprodukovateľnosť testu BluePrint medzi rôznymi lokalitami bola 100 % a medzi rôznymi skenermi bola tiež 100 %. Okrem toho sa zaznamenala vysoká precíznosť (98,6 %) a opakovateľnosť (99 %) (6).

Okrem toho sa v prípade FG-array nezistil žiadny rozdiel medzi výsledkami opakovaných izolácií RNA, rozdiel v precízności (98,98 % pre luminálny typ, 98,87 % pre typ HER2 a 98,84 % pre bazálny typ), reprodukovateľnosti (98,71 % pre luminálny typ, 98,43 % pre typ HER2 a 98,24 % pre bazálny typ) a opakovateľnosti (99,08 % pre luminálny typ, 99,03 % pre typ HER2 a 98,96 % pre bazálny typ) a zistila sa zhoda medzi výsledkami 8pack a FG-array dvoch samostatných súborov údajov 98,91 % (n = 92) a 99,86 % (n = 698).

Hlásiteľný rozsah indexu BluePrint FFPE predstavuje koreláciu profilu expzie s templátmi (priemerné úrovne expzie mRNA nádorov luminálneho, bazálneho typu a typu HER2). Molekulárny podtyp vzorky sa potom určí podľa toho, ktorý má najvyšší index BluePrint.

Na súbore celého genómu (FG-array) sa vykonala štúdia interferencie s cieľom posúdiť, či štyri relevantné látky interferujú s výsledkami BluePrint FFPE. Výsledky ukázali, že kontaminácia DNA až do 2,5-násobku úrovne pozadia a prídanie proteínov počas izolácie RNA, ako aj prenos etanolu a AMPure XP Beads počas purifikácie cDNA, neovplyvnili výsledky BluePrint. Celkovo interferujúce zložky tkaniva neovplyvňujú index BluePrint, keďže pôvodná séria nádorov bola reprezentatívna pre vzorky rakoviny prsníka a aj tu boli ostatné zložky tkaniva náhodne rozložené a nesúviseli s výsledkom ochorenia<sup>(1)</sup>.

Na posúdenie hranice detekcie sa výsledky BluePrint FFPE porovnali v rôznych riedeniach a ukázali sa veľmi stabilné výsledky aj pri veľmi nízkych prídaniach množstiev cDNA na čip (array). Na základe výsledkov je hranica detekcie pre prídanie cDNA 900 ng. Okrem toho sa zistilo, že LoD pre prídanie množstva RNA získaný zo samostatnej štúdie je 19,98 ng.

## Objednanie testu

---

Súpravu na odber vzoriek vám poskytne vaša kontaktná osoba spoločnosti Agendia. Pomocou súpravy pridajte vzorku nádoru na podložné sklíčka podľa pokynov alebo pripravte blok FFPE. Objednávku vykonajte prostredníctvom nášho online portálu alebo vyplnením formulára žiadosti o test, ktorý nájdete v súprave na odber vzoriek, podrobnosti nájdete v návode na použitie tejto súpravy.

Ak potrebujete dodatočnú podporu alebo informácie, kontaktujte nás prosím na adrese [Customerservice@agendia.com](mailto:Customerservice@agendia.com) alebo +31 (0)20 462 1510.

## Odkazy

---

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

### Dôležité upozornenie:

Akýkoľvek vážny incident súvisiaci s BluePrint FFPE nahláste bezodkladne výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu. Výrobca nahlási závažný incident príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ/pacient sídlo.

### Dodatky na zlepšenie klinického laboratória (CLIA)

Osvedčenia o akreditácii: Agendia, Inc.: 05D1089250

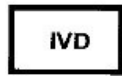
### Podrobnosti ohľadom výroby



Agendia NV  
Radarweg 60  
1043 NT Amsterdam, Holandsko  
Telefón: +31 (0)20 462 1510  
e-mail: [customerservice@agendia.com](mailto:customerservice@agendia.com)

Adresa laboratória diagnostických služieb spoločnosti Agendia Agendia, Inc.:  
22 Morgan,  
Irvine, CA 92618, USA  
Telefón: +1 888 321 2732  
Fax: +1 866 756 7548  
[www.agendia.com](http://www.agendia.com)

Základný UDI-DI: 0850024841BlueprintBB



© 2021 Agendia, NV. Všetky práva vyhradené. Agendia, logo Agendia a BluePrint sú registrované ochranné známky spoločnosti Agendia, NV.

MKT-518-2

Dátum vydania: Február 2025

**Úpravy predchádzajúcej verzie**

Verzia 2 – aktualizácia zamýšľaného použitia, časti s referenciami, výkonnostných charakteristík a upozornení a bezpečnostných opatrení

Prvé vydanie – november 2022