

Navodila za uporabo – mikromrežni test Blueprint FFPE

Uvod

Test Blueprint je test za določanje molekularnega podtipa, ki razvrsti raka dojk na tri različne podtipe, tj. luminalni tip, tip HER2 in bazalni tip, na podlagi dejanskega biološkega profila tumorja z uporabo izražanja genov. Določitev molekularnega podtipa omogoča optimalnejšo izbiro zdravljenja, saj imajo lahko tumorji, ki se na podlagi histopatoloških značilnosti morda zdijo enaki, v resnici zelo različne klinične izide. ^(1,2,3)

Z uporabo 200 prvotnih vzorcev bolnic z rakom dojk in štirih ločenih kohort za potrditev (n = 748) so določili profil 80 genov za test Blueprint. ⁽¹⁾ Test Blueprint razlikuje med tremi intrinzičnimi podtipi raka dojk: luminalnim tipom, tipom HER2 in bazalnim tipom. Te intrinzične podskupine lahko z uporabo testov za ugotavljanje izražanja genov določimo natančneje kot s standardno oceno z imunohistokemijo (IHC) oziroma fluorescenčno hibridizacijo in situ (FISH). ^(2,4)

S testom Blueprint analiziramo profil izražanja 80 specifičnih genov v vzorcu tkiva z analizo izolirane RNA iz vzorcev tumorskega tkiva na posebnih steklenih mikromrežnih ploščicah. Z uporabo lastniškega algoritma test Blueprint določi indeks korelacije profila 80 genov z vsakim od treh različnih osrednjih molekularnih tipov: luminalnim tipom, tipom HER2 in bazalnim tipom.

Predvidena uporaba

Blueprint FFPE je kvalitativen, neavtomatiziran diagnostični test in vitro, ki ga izvajamo v diagnostičnem laboratoriju podjetja Agendia z uporabo profila izražanja genov, pridobljenega iz vzorcev rakavega tkiva dojk, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin (FFPE), za določitev molekularnega podtipa.

Blueprint predvideva obseg koristi sistemskega zdravljenja za vodenje odločitev o zdravljenju pri bolnicah z rakom dojk.

Geni Blueprint merijo značilnosti večstopenjskega razvoja celic raka dojke za preživetje, razmnoževanje, razširjanje in metastaziranje, kot so odkrili v znakih raka⁽⁵⁾.

Test se izvaja pri bolnicah z rakom dojk v 1., 2. ali 3. stadiju. Rezultat testa Blueprint® FFPE lahko zdravniki uporabijo le kot prognostični kazalnik, skupaj z drugimi kliničnopatološkimi dejavniki.

Predvideni uporabnik

Testiranje z mikromrežnim testom Blueprint FFPE lahko naroči lečeči zdravnik bolnice z rakom dojk. Z naročilom testiranja z mikromrežnim testom Blueprint FFPE zdravnik zaprosi podjetje Agendia, da v svojem diagnostičnem laboratoriju testira vzorec.

Princip delovanja testa

Analiza temelji na več neavtomatiziranih postopkih, ki so naslednji: izolacija RNA iz rezin rakavega tkiva dojk FFPE, reverzna transkripcija RNA, pri kateri nastane cDNA, amplifikacija in označevanje cDNA, hibridizacija amplificirane in označene cDNA na diagnostično mikromrežo, izpiranje in branje diagnostične mikromreže ter zajem podatkov (ekstrakcija lastnosti), izračun in določitev molekularnega podtipa (Blueprint).

Analiza BluePrint je namenjena ugotavljanju aktivnosti specifičnih genov v vzorcu tkiva. Rezultat je profil izražanja oziroma »prstni odtis« vzorca. Izračuna se korelacija profila izražanja s predlogami (povprečnimi ravnmi izražanja mRNA pri tumorjih luminalnega tipa, bazalnega tipa in tipa HER2) (indeks BluePrint) ter določi molekularni podtip vzorca (t. bazalni tip, luminalni tip ali tip HER2).

Opozorila in previdnostni ukrepi

Identifikacijski podatki bolnice na obrazcu za naročilo se morajo natančno ujemati z identifikacijskimi podatki vzorca v sistemu LIMS, ki ustvari interni identifikator, ki se mora natančno ujemati z vzorcem, ki se obdeluje v laboratoriju.

Obrazec za naročilo testiranja izpolnite s pravilnimi podatki.

Vzorec, izbran za testiranje s testom BluePrint, se mora ujemati z značilnostmi populacije, za katero je predviden, kar med drugim vključuje raka dojke pri ženskah, zgodnji stadij in najmanj 30 % tumorskih celic.

Rezultate testa BluePrint lahko zdravniki uporabijo skupaj s standardnimi kliničnopatološkimi dejavniki. Test ni namenjen ugotavljanju izida bolezni.

Postopek

a) Izbira bolnikov

Bolnice so primerne, če so jim diagnosticirali raka dojke v 1., 2. ali 3. stadiju.

b) Odvzem, registracija in pošiljanje vzorca

Informacije o pogojih za odvzem vzorca, ravnanje z njim in njegovo pripravo so stranki na voljo v navodilih za uporabo: MKT-067. Ta komplet vsebuje naslednje:

- 10 mikroskopskih stekelc,
- 2 nosilca za pet stekelc,
- majhno in veliko plastično vrečko na zadrgo,
- navodila za odvzem vzorca,
- obrazec za naročilo testiranja,
- list z nalepkami s črtno kodo,
- embalažo za pošiljanje.

Registracija vzorca se izvede po prejemu naročila zdravnika, ki je naročil testiranje. Naročilo (obrazec za naročilo testiranja) lahko odda prek spletnega portala za stranke ali po drugih komunikacijskih kanalih. Podjetje Agendia registrira vse povezane podatke o vzorcih in bolnicah. Zdravnik, ki je naročil testiranje, mora vzorec poslati neposredno v diagnostični laboratorij podjetja Agendia, in sicer pri temperaturi okolja in z uporabo priložene embalaže za pošiljanje po pošti.

c) Analiza vzorca v podjetju Agendia

Za vzorce tkiva FFPE se uporabijo stekelca z rezinami tkiva FFPE, ki jih posreduje stranka, ali pa pripravimo preparate iz bloka tumorskega tkiva FFPE, ki ga posreduje stranka, z uporabo standardnega mikrotoma. Iz tkivnih

rezin z uporabo standardnega kompleta za izolacijo, ki je na voljo na trgu, ekstrahiramo celotno RNA. Vzorec RNA očistimo, amplificiramo in označimo s fluorescentnim barvilom cianin-CTP/dUTP.

Vzorec RNA/cDNA hibridiziramo na posebno diagnostično mikromrežo (8 kosov, Agilent Technologies). S čitalnikom za mikromreže podjetja Agilent preberemo diagnostično mikromrežo in rezultate dobimo v datoteki z rezultati branja (TIFF). To datoteko uporabimo v programski opremi podjetja Agilent za ekstrakcijo lastnosti. Programska oprema za ekstrakcijo lastnosti analizira datoteko z rezultati branja (TIFF), pri čemer ugotavlja relativne intenzivnosti fluorescence posameznih lastnosti glede na datoteko z zasnovo diagnostične mikromreže, ki jo uporabi kot predlogo, da opredeli kontrolne lastnosti, lastnosti normaliziranja in lastnosti označevalnega gena. Intenzivnosti fluorescence lastnosti so merilo za izražanje določenih genov.

d) Analiza podatkov in poročanje

Podatki se analizirajo v skladu s posebnim algoritmom BluePrint, ki izračuna indekse BluePrint in določi molekularni podtip vzorca (bazalni tip, luminalni tip ali tip HER2).

Za zagotovitev pravih analitičnih rezultatov se uporabljajo številne kontrole kakovosti (> 25). Preverjanja kakovosti skupaj z rezultati interno beleži in potrjuje vodja laboratorija.

e) Poročanje

Zdravnik, ki je naročil testiranje, prejme izvid bolnice ter povzetek rezultatov za vsak naročeni mikromrežni test BluePrint FFPE. Glede osebnih podatkov bolnic si preberite naše pogoje obdelave podatkov v pravilniku o zasebnosti podjetja Agendia.

Omejitve postopka

Test BluePrint so potrdili le za uporabo z rakavim tkivom dojk žensk. Pri testiranju drugih vrst vzorcev lahko dobimo napačne rezultate ali pa rezultatov sploh ne dobimo. Zanesljivi rezultati so odvisni od odvzema zadostne količine vzorca in načina pošiljanja.

Test BluePrint so posebej potrdili za tumorje, ki so invazivni duktalni karcinomi ali lobularni karcinomi. Testiranja drugih vrst vzorcev (npr. bezgavk) niso ocenjevali.

Pričakovane vrednosti

Test BluePrint FFPE razvrsti vzorce rakavega tkiva dojk na tri različne podtipe: luminalnim tipom, tipom HER2 in bazalnim tipom. Podtip z najvišjo vrednostjo indeksa določi molekularni podtip tumorja.

Luminalni tip

Za luminalni tip raka dojk je značilno izražanje genov na luminalnih epiteljskih celicah, ki obdajajo mlečne vode in žleze.

Tip HER2

Za HER2-tip raka dojk je značilna amplifikacija oziroma prekomerno izražanje lokusa HER2.

Raki tipa HER2 so običajno HER2-pozitivni tumorji pri IHC oziroma FISH (HER2/neu-pozitivni). Če rezultat testa BluePrint pokaže, da gre za tip HER2, pomeni, da je fenotip tumorja najbolj podoben intrinzičnemu podtipu HER2.

Bazalni tip

Za bazalni tip raka dojke je značilno izražanje genov na celicah bazalnega/mioepitelijskega izvora. Raki bazalnega tipa so običajno trojno negativni na ER, PR in HER2 ter imajo specifičen profil izražanja genov.

Če rezultat testa Blueprint pokaže, da gre za bazalni tip, pomeni, da je fenotip tumorja najbolj podoben intrinzičnemu bazalnemu podtipu.

Lastnosti delovanja

Značilnosti delovanja, raziskane za test Blueprint, vključujejo: natančnost in ponovljivost, razpon, o katerem se poroča, analitično specifičnost in mejo zaznave

Analitična učinkovitost

Skladnost rezultatov iz tkiv Fresh in FFPE je bila ocenjena v dveh študijah, kjer je bilo ugotovljeno, da znaša 97 % (n=413) in 90 % (n=55), brez pristranskosti v rezultatih testa Blueprint med vrstama tkiv.

Blueprint je tudi stabilen v daljšem časovnem obdobju s ponovljivostjo med 97,6 % in 98,9 % in ponovljivostjo med različnimi izolacijami istega tkiva, kjer ni bilo opaziti pomembne razlike v podtipu (Cochranov Q-test, p=1,0) in indeksih (ANOVA luminalni p=0,850, HER2 p=0,725 in bazalni p=0,400). Ponovljivost testa Blueprint med različnimi lokacijami je bila 100-odstotna in med različnimi skenerji je bila prav tako 100-odstotna. Poleg tega sta bili opaženi visoka natančnost (98,6 %) in ponovljivost (99 %) (6).

Poleg tega za niz FG ni bilo ugotovljene razlike med rezultati ponavljajočih se izolacij RNA, natančnostjo (98,98 %, 98,87 % oziroma 98,84 % za luminalni, HER2 oziroma bazalni), ponovljivostjo (98,71 %, 98,43 % in 98,24 % za luminalni, HER2 oziroma bazalni) in ponovljivostjo (99,08 %, 99,03 % in 98,96 % za luminalni, HER2 oziroma bazalni), ujemanje med rezultati 8pack in niz FG dveh ločenih nizov podatkov pa je bilo 98,91 % (n = 92) in 99,86 % (n = 698).

Razpon indeksa Blueprint FFPE, o katerem se poroča, je korelacija profila izražanja s predlogami (povprečne ravni izražanja mRNA tumorjev luminalnega, bazalnega in HER2 tipa). Molekularni podtip vzorca se nato določi s tistim z najvišjim indeksom Blueprint.

Študija interference je bila izvedena na celotnem genomskem nizu (niz FG), da bi ocenili, ali štiri pomembne snovi motijo rezultate testa Blueprint FFPE. Rezultati so pokazali kontaminacijo DNK do 2,5-krat večjo od ravni ozadja in najvišje vrednosti beljakovin med izolacijo RNK ter prenos etanola in kroglic AMPure XP Beads med čiščenjem cDNK niso vplivali na rezultate testa Blueprint. Na splošno moteče komponente tkiva ne vplivajo na indeks testa Blueprint, saj je bila prvotna serija tumorjev reprezentativna za vzorce raka dojke in tudi tukaj so bile druge komponente tkiva naključno porazdeljene ter niso bile povezane z izidom bolezni⁽¹⁾.

Za oceno meje zaznavnosti so rezultate testa Blueprint FFPE primerjali med različnimi razredčitvami in pokazali zelo stabilne rezultate tudi pri zelo nizkih vnosih cDNA v nizu. Na podlagi rezultatov je meja zaznavanja za vnos cDNA 900 ng. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da je LoD za vnos RNA, pridobljen iz ločene študije, 19,98 ng.

Naročilo testiranja

Kontaktna oseba pri podjetju Agendia vam bo posredovala komplet za odvzem vzorca. Z uporabo kompleta vzorec tumorja nanesite na stekelca v skladu z navodili ali pa pripravite blok FFPE. Oddajte naročilo prek našega spletnega portala ali izpolnite obrazec za naročilo testiranja, ki je priložen kompletu za odvzem vzorca. Podrobnosti so v navodilih za uporabo tega kompleta.

Če potrebujete dodatno pomoč ali informacije, stopite v stik z nami prek Customerservice@agendia.com ali +31 (0)20 462 1510.

Seznam literature

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

Opozorilo:

O vseh morebitnih resnih zapletih, povezanih s testom BluePrint FFPE, poročajte proizvajalcu in pristojnemu organu države članice. Proizvajalec bo o resnem zapletu poročal pristojnemu organu države članice, v kateri se nahaja uporabnik oziroma bolnica.

Spremembe in dopolnila, namenjena izpopolnitvam v kliničnem laboratoriju (CLIA) Potrdila o akreditaciji:

Agendia, Inc.: 05D1089250

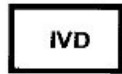
Podatki o proizvajalcu



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

Naslov diagnostičnega laboratorija podjetja
Agendia Agendia, Inc.:
22 Morgan,
Irvine, CA 92618, ZDA
Telefon: +1 888 321 2732
Faks: +1 866 756 7548
www.agendia.com

Osnovni UDI-DI: 0850024841BlueprintBB



© 2021 Agendia, NV. Vse pravice pridržane. Agendia, logotip Agendia in BluePrint so registrirane blagovne znamke podjetja Agendia, NV.

MKT-518-2

Datum izdaje: Februar 2025

Spremembe prejšnje različice

Različica 2 – posodobitev predvidene uporabe, referenčni del, karakteristike delovanja ter opozorila in previdnostni ukrepi

Prva izdaja – november 2022