

Návod k použití – BluePrint FFPE Microarray

Úvod

BluePrint je molekulární subtypizační test, který se používá ke klasifikaci karcinomu prsu do tří různých podtypů: lumenální typ, HER2 typ a bazální typ na základě stanovení skutečného biologického profilu nádoru pomocí genové exprese. Molekulární subtypizace zlepšuje rozhodování o léčbě, protože nádory, které se mohou na základě histopatologických znaků jevit jako identické, mohou mít ve skutečnosti velmi odlišné klinické výsledky. ^(1,2,3)

Na základě 200 úvodních vzorků pacientek s karcinomem prsu a čtyř nezávislých validačních kohort (n = 748) byl vytvořen 80genový profil BluePrint. ⁽¹⁾ BluePrint umožňuje rozlišit tři základní podtypy karcinomu prsu: lumenální typ, HER2 typ a bazální typ. Tyto základní podskupiny jsou přesněji identifikovány pomocí panelů genové exprese ve srovnání se standardním hodnocením IHC/FISH. ^(2,4)

Test BluePrint analyzuje profil exprese 80 specifických genů ve vzorku tkáně pomocí RNA izolované ze vzorků nádorové tkáně technikou microarray na speciálních skleněných destičkách. Test BluePrint stanovuje pomocí chráněného algoritmu korelační index 80genového profilu u každého ze tří různých molekulárních subtypizačních centroidů: lumenální typ, HER2 typ a bazální typ.

Zamýšlené použití

BluePrint FFPE je kvalitativní neautomatizovaný diagnostický test in vitro, který se provádí v diagnostické laboratoři společnosti Agendia a používá se ke stanovení molekulárního podtypu na základě profilu genové exprese získaného ze vzorků tkáně karcinomu prsu fixovaných ve formalínu a zalitých do parafínu (FFPE).

BluePrint predikuje velikost přínosu systémové léčby pro rozhodování o léčbě u pacientek s karcinomem prsu.

Test genů BluePrint měří charakteristiky vícestupňového vývoje buněk karcinomu prsu, které přežívají, proliferují, diseminují a metastazují, jak bylo zjištěno v rámci charakteristických znaků karcinomu⁽⁵⁾.

Test se provádí u pacientek s karcinomem prsu ve stadiu I, II nebo III. Výsledek testu BluePrint® FFPE je určen k použití lékaři a měl by být interpretován spolu s dalšími klinicko-patologickými faktory.

Zamýšlený uživatel

Test BluePrint FFPE microarray se provádí na žádost lékaře, který poskytuje péči pacientkám s karcinomem prsu. Objednáním testu BluePrint FFPE microarray žádá lékař společnost Agendia o provedení testu na dodaném vzorku v diagnostické laboratoři společnosti Agendia.

Princip testu

Analýza je založena na několika neautomatizovaných procesech: izolace RNA z tkáňových řezů karcinomu prsu fixovaných formalínem a zalitých v parafínu (FFPE); reverzní transkripce RNA umožňující získání cDNA; amplifikace a značení cDNA; hybridizace amplifikované a značené cDNA na diagnostickém microarray čipu; promývání a skenování diagnostických microarray čipů a akvizice dat (extrakce příznaků); výpočet a stanovení molekulárního podtypu (BluePrint).

Analýza Blueprint je určena ke stanovení aktivity specifických genů ve vzorku tkáně. Výsledkem je expresní profil neboli „otisk prstu“ vzorku. Vypočítá se korelace expresního profilu se šablonami (průměrné hladiny exprese mRNA nádorů lumenálního, bazálního a HER2-typu) (index Blueprint) a určí se molekulární podtyp vzorku (tj. bazální typ, lumenální typ, HER2-typ).

Upozornění a bezpečnostní opatření

Identifikace pacientky v žádance musí správně odpovídat identifikaci vzorku v rámci systému LIMS, čímž se vytvoří interní identifikátor, který by měl být správně přiřazen ke vzorku v laboratorním procesu.

Vyplňte příslušné informace do žádanky na test

Vzorek vybraný pro vyšetření pomocí testu Blueprint by měl odpovídat kritériím pro danou populaci, např. karcinom prsu u žen, časné stadium a podíl nádorových buněk nejméně 30 %.

Výsledky testu Blueprint jsou indikovány k použití ze strany lékařů společně s dalšími klinicko-patologickými faktory. Test není určen pro stanovení výsledku onemocnění.

Postup

a) Výběr pacientek

Pacientky jsou způsobilé k absolvování testu, pokud je u nich diagnostikován karcinom prsu ve stadiu I, II nebo III.

b) Odběr, registrace a odeslání vzorků.

Podmínky pro odběr, zacházení s odebranými vzorky a jejich přípravu jsou uvedeny v návodu k použití (IFU): MKT-067. Tato souprava obsahuje následující položky:

- 10 mikroskopických sklíček
- 2 nosiče po pěti sklíčkách
- Malý a velký plastový sáček na zip
- Pokyny pro odběr vzorků
- Formulář žádanky o test
- Arch samolepicích štítků s čárovým kódem
- Přepavní materiály

Registrace vzorku je zahájena oznámením od objednavatele zdravotní péče. Toto oznámení (formulář žádanky na test) může být provedeno prostřednictvím online zákaznického portálu nebo jiného komunikačního kanálu. Společnost Agendia eviduje všechny související informace o vzorku a pacientce. Zdravotnické zařízení, které vystavuje objednávku, odesílá vzorek přímo do laboratoře diagnostických služeb společnosti Agendia, a to při pokojové teplotě, s využitím dodaných přepravních materiálů od kurýrní služby.

c) Analýza vzorků ve společnosti Agendia

K provedení testu se používají skleněná sklíčka s tkáňovými řezy FFPE dodaná zákazníkem nebo se sklíčka vyrobí z FFPE bloku nádoru dodaného zákazníkem pomocí standardního mikrotomu. Celková RNA se extrahuje z tkáňových řezů pomocí standardní komerčně dostupné izolační soupravy. Vzorek RNA je purifikován, amplifikován a označen fluorescenčním barvivem cyanin-CTP/dUTP.

Vzorek RNA/cDNA se hybridizuje na speciálně navrženém diagnostickém microarray čipu (balení po 8, Agilent Technologies).

Ke skenování diagnostického microarray čipu se používá skener Agilent a výsledkem skenování je soubor ve formátu TIFF. Tento soubor se analyzuje pomocí softwaru pro analýzu microarray Agilent Feature Extraction Software. Feature Extraction Software analyzuje soubor ze skenování (TIFF) stanovením relativní intenzity fluorescence jednotlivých vlastností oproti kontrolnímu souboru diagnostického microarray čipu, který slouží jako šablona, a umožňuje tak identifikovat řídicí vlastnosti, normalizační vlastnosti a vlastnosti reportérových genů. Intenzita fluorescence jednotlivých vlastností je měřítkem exprese jednotlivých genů.

d) Analýza dat a hlášení

Analýza dat se provádí podle specifického algoritmu BluePrint, který vypočítá indexy BluePrint a stanoví molekulární podtyp vzorku (bazální typ, luminální typ nebo typ HER2).

Pro zajištění správného analytického výsledku jsou prováděny rozsáhlé kontroly kvality (> 25). Kontroly kvality jsou hlášeny a schvalovány interně spolu s výsledky ředitelem laboratoře.

e) Hlášení

Poskytovatel zdravotní péče, který objednal provedení testu, obdrží Zprávu pacientky a Souhrn výsledků pro každý objednaný test BluePrint FFPE microarray. Pokud jde o osobní údaje pacientek, přečtěte si prosím naše podmínky zpracování údajů v Zásadách ochrany osobních údajů společnosti Agendia.

Omezení testu

Test BluePrint je validován k použití pouze pro nádorovou tkáň karcinomu prsu u žen. Testování jiných typů vzorků může vést k nesprávným výsledkům nebo nemusí poskytnout žádné výsledky. Spolehlivé výsledky závisí na vhodných postupech při odběru a přepravě vzorků.

Test BluePrint je specificky validován pro nádory, které jsou klasifikovány jako invazivní duktální karcinom nebo lobulární karcinom. Testování jiných typů vzorků (např. lymfatických uzlin) nebylo hodnoceno.

Očekávané hodnoty

Test BluePrint FFPE umožňuje klasifikovat vzorky tkáně z karcinomu prsu do tří různých podtypů: luminální typ, HER2 typ a bazální typ. Molekulární podtyp nádoru určuje podtyp s nejvyšším indexovým skóre.

Luminální typ

Luminální typ karcinomu prsu je charakterizován genovou expresí luminálních epiteliálních buněk, které tvoří výstelku mlékovodů a mléčných žláz.

Typ HER2

Karcinom prsu typu HER2 je charakterizován amplifikací nebo nadměrnou expresí lokusu HER2.

Karcinomy typu HER2 jsou obvykle HER2 pozitivní nádory při stanovení pomocí IHC nebo FISH (HER2/neu pozitivní). Výsledek testu BluePrint typu HER2 znamená, že fenotyp nádoru se nejvíce podobá základnímu podtypu HER2.

Bazální typ

Karcinomy prsu bazálního typu jsou charakterizovány genovou expresí bazálních/myoepitelových buněk. Karcinomy bazálního typu jsou obvykle triple negativní na ER, PR a HER2 a vykazují specifický profil genové exprese.

Výsledek testu Blueprint bazálního typu znamená, že fenotyp nádoru se nejvíce podobá základnímu bazálnímu podtypu.

Funkční charakteristiky

Hodnocené funkční charakteristiky pro test Blueprint zahrnují: preciznost a reprodukovatelnost, vykazovaný rozsah, analytickou specifickou a mez detekce

Analytická účinnost

Shoda výsledků z čerstvých a FFPE tkání byla hodnocena ve dvou studiích, kde bylo zjištěno, že činí 97 % (n=413) a 90 % (n=55), přičemž výsledky testu Blueprintu nebyly mezi oběma typy tkání zkresleny.

Blueprint je také stabilní v čase s reprodukovatelností mezi 97,6 % a 98,9 % a reprodukovatelný mezi různými izolacemi stejné tkáně, kde nebyl pozorován žádný významný rozdíl v podtypu (Cochranův Q-test, p=1,0) a indexech (ANOVA luminální p=0,850, HER2 p=0,725 a bazální p=0,400). Reprodukovatelnost testu Blueprint mezi různými místy byla 100 % a mezi různými skenery také 100 %. Dále byla zjištěna vysoká preciznost (98,6 %) a opakovatelnost (99 %) (6).

Navíc u FG-čipu nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi výsledky opakovaných izolací RNA, preciznosti (98,98 %, 98,87 % a 98,84 % pro luminální, HER2 a bazální, v tomto pořadí), reprodukovatelnosti (98,71 %, 98,43 % a 98,24 % pro luminální, HER2 a bazální, v tomto pořadí) a opakovatelnosti (99,08 %, 99,03 % a 98,96 % pro luminální, HER2 a bazální, v tomto pořadí) a shoda mezi výsledky balení po 8 a FG-čipu dvou samostatných souborů dat byla zjištěna na úrovni 98,91 % (n = 92) a 99,86 % (n = 698).

Vykazovaný rozsah indexu Blueprint FFPE je korelace expresního profilu se šablonami (průměrné hladiny exprese mRNA nádorů luminálního, bazálního a HER2 typu). Molekulární podtyp vzorku je pak stanoven podle toho, který má nejvyšší index Blueprint.

Byla provedena interferenční studie na celogenomovém čipu (FG-čip) s cílem posoudit, zda čtyři relevantní látky interferují s výsledky testu Blueprint FFPE. Výsledky ukázaly kontaminaci DNA až 2,5x vyšší než pozadí a spike proteiny během izolace RNA, a také, že přenos etanolu a AMPure XP Beads při purifikaci cDNA neovlivnily výsledky testu Blueprint. Celkově lze říci, že interferující složky tkáně neovlivňují výsledek testu Blueprint, protože původní série nádorů byla reprezentativní pro vzorky karcinomu prsu a i de byly ostatní složky tkáně náhodně rozloženy a nesouvisely s výsledkem onemocnění⁽¹⁾.

Pro posouzení meze detekce byly výsledky testu Blueprint FFPE porovnány v různých ředěních a ukázaly velmi stabilní výsledky i při velmi nízké vstupní cDNA na čipu. Na základě výsledků je mez detekce pro vstupní cDNA 900ng. Kromě toho bylo zjištěno, že LoD pro vstupní RNA odvozené ze samostatné studie je 19,98 ng.

Objednání testu

Soupravu pro odběr vzorků získáte od kontaktní osoby společnosti Agendia. Pomocí soupravy přidejte vzorek nádoru na sklíčka podle pokynů nebo připravte FFPE blok. Vytvořte objednávku prostřednictvím našeho online portálu nebo vyplněním formuláře žádanky na test, který je přiložen v soupravě pro odběr vzorků, podrobnosti jsou uvedeny v návodu k použití této soupravy.

Pokud potřebujete další podporu nebo informace, kontaktujte nás na adrese Customerservice@agendia.com nebo na čísle +31 (0)20 462 1510.

Reference

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

Upozornění:

Veškeré závažné události související s testem BluePrint FFPE nahlaste výrobci a příslušnému orgánu členského státu. Výrobce ohlásí závažnou událost příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel/pacientka registrován.

Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Osvědčení o akreditaci: Agendia, Inc.:
05D1089250

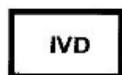
Informace o výrobci



Agendia NV
Radarweg 60
1043 NT Amsterdam, Nizozemsko
Telefon: +31 (0)20 462 17 1510
e-mail: customerservice@agendia.com

Adresa diagnostické laboratoře společnosti
Agendia Agendia, Inc.:
22 Morgan,
Irvine, CA 92618, USA
Telefon: +1 888 321 2732
Fax: +1 866 756 7548
www.agendia.com

Základní UDI-DI: 0850024841BlueprintBB



© 2021 Agendia, NV. Všechna práva vyhrazena. Agendia, logo Agendia a BluePrint jsou registrované ochranné známky společnosti Agendia, NV.

MKT-518-2

Datum vydání: únor 2025

Úpravy předchozí verze

Verze 2 - aktualizace zamýšleného použití, referenční části, funkčních charakteristik a varování a bezpečnostních opatření

První vydání - listopad 2022