

## Návod k použití – MammaPrint FFPE Microarray

### Úvod

MammaPrint je test ke stanovení profilu genové exprese určený k predikci klinického výsledku u pacientek s karcinomem prsu. Tento test byl vyvinut na základě odůvodnění, že přirozená historie nádoru je určována jeho základními regulačními genovými drahami, a profily genové exprese proto mohou vedle standardní klinické patologie přesněji predikovat prognózu a odpověď na léčbu.

Genový podpis MammaPrint byl stanoven pomocí nezaujatého přístupu na základě analýzy 25 000 genů v neléčených vzorcích primárních nádorů prsu a porovnáním profilů genové aktivity u pacientek, u nichž se v průběhu 5 let neobjevily vzdálené metastázy, a pacientek, u kterých se tyto metastázy objevily. Výsledkem byl profil 70 genů, který dokázal odlišit pacientky s vysokým rizikem vzniku metastáz od těch, u nichž bylo dlouhodobé riziko vzniku vzdálených metastáz natolik nízké, že by systémová léčba nepřinesla žádný nebo jen malý klinický přínos. <sup>(1,2)</sup>

*Riziko recidivy* – Test MammaPrint analyzuje expresi 70 specifických genů ve vzorku tkáně pomocí RNA izolované ze vzorků nádoru prsu technikou microarray na speciálních skleněných destičkách. Expresní profil se následně použije v chráněném algoritmu, který kategoricky klasifikuje pacientku jako pacientku s vysokým nebo nízkým rizikem recidivy karcinomu prsu.

### **Zamýšlené použití**

---

MammaPrint® FFPE je kvalitativní neautomatizovaný diagnostický test in vitro, který se provádí v diagnostické laboratoři společnosti Agendia a využívá profil genové exprese získaný ze vzorků tkáně karcinomu prsu fixovaných ve formalínu a zalitých do parafínu (FFPE) k vyhodnocení rizika vzniku vzdálených metastáz u pacientky během následujících 5 let.

Test MammaPrint poskytuje prognostické informace týkající se rizika vzdálených metastáz u pacientky a predikci velikosti přínosu systémové léčby pro rozhodování o léčbě u pacientek s karcinomem prsu.

Test genů MammaPrint měří charakteristiky vícestupňového vývoje buněk karcinomu prsu, které přežívají, proliferují, diseminují a metastazují, jak bylo zjištěno v rámci charakteristických znaků karcinomu<sup>(3)</sup>.

Test se používá u pacientek s rakovinou prsu v prvním, nebo druhém stádiu onemocnění, které mají negativní lymfatické uzliny, nebo až 3 pozitivní lymfatické uzliny, s nádorem menším nebo rovným 5,0 cm, a také pro pacientky ve třetím stádiu onemocnění. Výsledek testu MammaPrint® FFPE je určen k použití lékaři a měl by být interpretován spolu s dalšími klinicko-patologickými faktory.

### **Zamýšlený uživatel**

---

Test MammaPrint FFPE microarray se provádí na žádost lékaře, který poskytuje péči pacientkám s karcinomem prsu. Objednáním testu MammaPrint 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 diagnostických microarray čipech; promývání a skenování diagnostických microarray čipů a akvizice dat (extrakce příznaků); výpočet a stanovení rizika recidivy (MammaPrint).

Analýza MammaPrint je určena ke stanovení genové aktivity specifických genů ve vzorku tkáně. Výsledkem je expresní profil neboli „otisk prstu“ vzorku. Na základě expresního profilu se vypočítá MammaPrint Index a stanoví se molekulární profil vzorku (nízké riziko, vysoké riziko).

### **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 MammaPrint by měl odpovídat charakteristikám dané populace, např. karcinom prsu u žen, časné stadium a nejméně 30 % nádorových buněk.

Výsledky testu MammaPrint jsou určeny k použití lékaři jako molekulární profil společně s dalšími klinicko-patologickými faktory. Test není určen pro stanovení výsledku onemocnění.

Výsledek testu MammaPrint Low Risk (nízké riziko) neposkytuje záruku, že v průběhu příštích pěti let nedojde k recidivě vzdálených metastáz. Stejně tak výsledek High Risk (vysoké riziko) neznamená, že s určitostí dojde k recidivě vzdálených metastáz. Výsledky testů je třeba interpretovat ve spojení s klinicko-patologickými faktory.

### **Postup**

---

#### **a) Výběr pacientek**

Pacientky jsou způsobilé k provedení testu, pokud je u nich diagnostikován karcinom prsu ve stadiu I, II nebo III s negativními lymfatickými uzlinami nebo s pozitivitou maximálně ve 3 lymfatických uzlinách, s velikostí nádoru ≤ 5,0 cm, nezávisle na stavu estrogenových receptorů (ER+/-).

#### **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 sklíčků
- 2 nosiče po pěti sklíčcích
- Malý a velký plastový sáček na zip
- Pokyny pro odběr vzorků
- Formulář žádanky o test
- Arch samolepicích štítků s čárovým kódem
- Převážní materiály

Registrace vzorku je zahájena oznámením od objednavatele zdravotní péče. Toto oznámení (Test Request Form-TRF) může probíhat prostřednictvím online zákaznického portálu nebo jiného komunikačního kanálu, kde společnost Agendia registruje všechny související informace o vzorku a pacientce. TRF je určen pouze pro jednu pacientku. 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***

Používají se tkáňové řezy FFPE, buď poskytnuté zákazníky na podložních sklíčkách, nebo připravené z nádorových bloků FFPE 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***

Analýza dat se provádí podle algoritmu MammaPrint, který vypočítá MammaPrint Index a určí molekulární profil vzorku (nízké riziko, vysoké riziko). Vzorky s hodnotou indexu MammaPrint vyšší než 0 jsou klasifikovány jako vzorky s nízkým rizikem a vzorky s hodnotou nižší nebo rovnou 0 jsou klasifikovány jako vzorky s vysokým rizikem.

Index MammaPrint vzorku může spadat do předem definované oblasti kolem klasifikační prahu mezi hodnotou  $MPI > -0,05$  a  $< 0,05$ , ve které má výsledek MammaPrint  $< 90\%$  klasifikační přesnost, nikoli však nižší než  $50\%$  (tj. hraniční vzorek).

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 MammaPrint 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 MammaPrint 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 MammaPrint 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**

---

Po provedení testu MammaPrint se vydává binární výsledek kategorizovaný buď jako „nízké riziko“, nebo „vysoké riziko“ recidivy. Molekulární profil vzorku se stanoví výpočtem MammaPrint Indexu (MPI) na stupnici od -1,000 do +1,000.

Stejně jako u jiných testů je i u našeho testu stanovena prahová hodnota pro klasifikaci. Pro MammaPrint je práh pro nízké a vysoké riziko nastaven na nulu, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti, a hodnoty  $> 0,000$  jsou klasifikovány jako nízké riziko a hodnoty  $\leq 0,000$  jsou klasifikovány jako vysoké riziko. Celková průměrná přesnost MPI je 98,5 %, přičemž hodnoty skóre  $< 0,1685$  nebo  $> 0,168$  vykazují přesnost přes 99 %.

### „Hraniční“ hodnoty MPI

Technická přesnost testu MammaPrint je sice extrémně vysoká, vzorky s hodnotou MPI velmi blízko nulové prahové hodnotě vykazují o něco nižší procentuální přesnost než vzorky vzdálenější od prahové hodnoty. Konkrétně v okolí nulové prahové hodnoty, v intervalu  $MPI > - 0,05$  a  $< 0,05$ , označovaném též jako hraniční oblast, klesá přesnost testu pod 90 %. Například při hodnotě MPI 0,04 je 86% pravděpodobnost, že výsledek MP je v pozitivním pásmu (nízké riziko), a 14% pravděpodobnost, že je v negativním pásmu (vysoké riziko). Zde je důležité poznamenat, že vzorky s hodnotami MPI mimo „hraniční“ oblast mají průměrnou přesnost přes 99 %.

## **Funkční charakteristiky**

---

Hodnocené funkční charakteristiky pro test MammaPrint zahrnují: preciznost a reprodukovatelnost, vykazovaný rozsah a klasifikační práh, analytickou specifičnost a mez detekce.

### Analytická účinnost

Shoda výsledků z čerstvých a FFPE tkání byla hodnocena ve dvou studiích, kde bylo zjištěno, že činí 91,5 % (n=221) a 94,3 % (n=345), přičemž výsledky testu MammaPrint nebyly mezi oběma typy tkání zkrasleny. Test MammaPrint je také stabilní mezi různými izolacemi, kde nebyl pozorován žádný významný rozdíl ( $p=0,994/p=0,290$ ), různými lokalitami, různými skenery a vykazuje vysokou preciznost (97,3 %), reprodukovatelnost (96 %) a opakovatelnost (97,8 %)<sup>(4)</sup>.

Navíc u FG-čipu nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi výsledky opakovaných izolací RNA, preciznosti (98,47 %) reprodukovatelnosti (97,73 %) a opakovatelnosti (98,74 %) a shoda mezi výsledky balení po 8 a FG-čipu dvou samostatných souborů dat byla zjištěna na úrovni 98,52 % (n = 135) a 94,27 % (n = 698).

Vykazovaný rozsah indexu MammaPrint je nastaven na hodnoty od -1,00 do + 1,00 a klasifikační práh MammaPrint Index (MPI) je nastaven na + 0,0. MPI nižší a rovný 0,0 je stanoven jako vysoké riziko, MPI vyšší než 0,0 je považován za nízké riziko<sup>(1, 2, 4)</sup>.

Byla provedena interferenční studie na celogenomovém čipu (FG-čip) s cílem posoudit, zda čtyři relevantní látky interferují s výsledky testu MammaPrint 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 MammaPrint. Celkově lze říci, že interferující složky tkáně neovlivňují MammaPrint Index, protože původní série nádorů byla reprezentativní pro vzorky karcinomu prsu a i zde byly ostatní složky tkáně náhodně rozloženy a nesouvisely s výsledkem onemocnění<sup>(1)</sup>.

Pro posouzení meze detekce byly výsledky testu MammaPrint 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 8,24 ng.

### Klinická validace

Výsledky jsou založeny na dříve publikovaných údajích pro 70genový molekulární profil <sup>(1)</sup>u nádorů prsu. Pacientky s dobrými výsledky jsou klasifikovány jako pacientky s nízkým rizikem (tj. bez vzdálených metastáz po dobu nejméně 5 let). Pacientky s horšími výsledky jsou klasifikovány jako pacientky s vysokým rizikem (tj. s vyšší pravděpodobností výskytu vzdálených metastáz do 5 let). V rámci výsledků se uvádí číselná hodnota indexu MammaPrint.

Test MammaPrint byl vyvinut s využitím populace pacientek s negativními lymfatickými uzlinami, pocházejících převážně z Evropy a dosud neléčených adjuvantní chemoterapií, s cílem zachytit biologii primárního nádoru v profilu genové exprese. <sup>(1,2)</sup> V lednu 2013 byly publikovány pětileté výsledky prospektivní observační studie RASTER <sup>(4)</sup>. Tato impaktivní studie zaměřená na biomarkery byla „první svého druhu“, ve které byl proveden a vyhodnocen test MammaPrint Fresh u 427 pacientek ve věku 18–61 let s časným stadiem karcinomu prsu, pT1 a pT2, s negativními lymfatickými uzlinami, ER+/-, HER 2 +/- před společným rozhodnutím lékaře a pacientky o adjuvantní léčbě. Pacientky byly léčeny pomocí standardních postupů s přihlédnutím ke všem relevantním klinicko-patologickým faktorům a výsledkům testu signatury MammaPrint.

Následně byl test MammaPrint proveden také na FFPE vzorcích tkáně pacientek ze studie RASTER. Výsledky testu MammaPrint byly porovnány na základě vyšetření 345 párových čerstvých a FFPE vzorků ze studie RASTER, u kterých byly k dispozici výsledky po 5 letech. Bez zohlednění jiných kovariát, než výsledku testu MammaPrint, byla u pacientek klasifikovaných podle MammaPrint FFPE jako „nízké riziko“ (71 pacientek s adjuvantní léčbou a 108 pacientek bez adjuvantní léčby) prokázána 1,3% (95% CI 0 - 3,1) pravděpodobnost recidivy karcinomu v průběhu 5 let <sup>(6)</sup>.

U pacientek klasifikovaných podle MammaPrint FFPE jako „vysoké riziko“ (145 s adjuvantní léčbou a 21 bez adjuvantní léčby) byla prokázána 11,7% (95% CI 6,6 - 16,8) pravděpodobnost recidivy karcinomu v průběhu 5 let <sup>(6)</sup>.

Test MammaPrint byl nezávisle validován ve studiích u více než 75 000 pacientek s karcinomem prsu, přičemž výsledky byly publikovány v předních recenzovaných lékařských a vědeckých časopisech na mezinárodní úrovni a bylo prokázáno, že test poskytuje informace nezávislé na klinicko-patologickém hodnocení rizika <sup>(6,7)</sup>.

### **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](mailto:Customerservice@agendia.com) nebo +31 (0)20 462 1510.

## Reference

---

1. van 't Veer et al. Nature 2002; 415(31): 530-536
2. van de Vijver et al. New Engl J Med 2002; 347(25): 1999-2009
3. Haan et. Al. Genes Chromosomes Cancer 2021; (61):148-160
4. Sapino et al. J Mol Diagnostics 2014; 16: 190-197
5. Drukker et al. Int J Cancer 2013; 133(4): 929-936
6. Beumer et al. Breast Cancer Res Treat 2016; DOI 10.1007/s10549-016-3764-5
7. Piccart a kol. Lancet Oncol. 2021;22(4):476-488

## Upozornění:

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

## Změny týkající se zlepšení klinických laboratoří (Clinical Laboratory Improvement Amendments - CLIA)

Osvědčení o akreditaci: Agendia, Inc.: 05D1089250

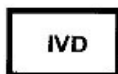
## Informace o výrobci



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

Základní UDI-DI: 0850024841MammaprintK9



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

MKT-517-V2

Datum vydání: únor 2025

### **Úpravy předchozí verze**

Verze 2 - Rozšíření zamýšleného použití, aktualizace analytické účinnosti, referenční části, varování a bezpečnostních opatření

První vydání - 3. listopadu 2022