

## MammaPrint FFPE in microarray - Istruzioni per l'uso

### **Introduzione**

Il test MammaPrint è un test riguardante il profilo di espressione genica che consente di prevedere l'esito clinico nelle pazienti affette da carcinoma mammario. È stato realizzato partendo dal presupposto che il decorso naturale di un tumore viene determinato dai percorsi genici regolatori sottostanti. Pertanto, grazie ai profili di espressione genica abbinati alla patologia clinica standard, è possibile prevedere in modo più accurato la prognosi e la risposta al trattamento.

Ricorrendo un approccio imparziale, la firma del gene MammaPrint è stata determinata effettuando un'analisi dell'intero genoma di 25.000 geni in campioni di carcinoma mammario primario non trattato e confrontando i profili di attività genica di pazienti senza metastasi a distanza in un periodo temporale di 5 anni con quelli di pazienti con metastasi. Ciò ha consentito di definire un profilo di 70 geni e di effettuare una distinzione tra le pazienti a rischio alto di sviluppare metastasi e quelle il cui rischio di metastasi a distanza a lungo termine era talmente basso che una terapia sistemica avrebbe apportato un beneficio clinico minimo o inesistente. <sup>(1,2)</sup>

*Rischio di recidiva* - Il test MammaPrint analizza l'espressione di 70 geni specifici in un campione di tessuto utilizzando l'RNA isolato da campioni di carcinoma mammario su vetrini microarray personalizzati. Il profilo di espressione viene quindi utilizzato in un algoritmo proprietario per categorizzare le pazienti come ad alto o basso rischio di recidiva di carcinoma mammario.

### ***Destinazione d'uso***

---

MammaPrint® FFPE è un test diagnostico in vitro qualitativo e 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 valutare il rischio di metastasi a distanza nelle pazienti in un arco di tempo di 5 anni.

MammaPrint fornisce informazioni prognostiche sul rischio di metastasi a distanza e sulla previsione dell'entità del beneficio della terapia sistemica per orientare le decisioni terapeutiche per le pazienti affette da carcinoma mammario.

I geni MammaPrint rilevano 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<sup>(3)</sup>.

Il test viene effettuato su pazienti affette da carcinoma mammario al primo o secondo stadio con linfonodi negativi o positivi con un massimo di 3 linfonodi positivi e un tumore di dimensioni fino a 5 cm e su pazienti al terzo stadio. L'esito del test MammaPrint® 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***

---

MammaPrint FFPE in microarray dovrà essere richiesto dal professionista sanitario presso cui la paziente affetta da carcinoma mammario è in cura. Ordinando il test MammaPrint FFPE in microarray, il professionista sanitario richiederà ad Agendia di effettuare il test sul campione a disposizione 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 rischio di recidiva (MammaPrint).

L'analisi MammaPrint è stata appositamente studiata per stabilire l'attività genica di determinati geni in un campione di tessuto. Il risultato è un profilo di espressione o "impronta digitale" del campione. Grazie a questo profilo di espressione, viene calcolato il cosiddetto "indice MammaPrint" e viene determinato il profilo molecolare del campione (a rischio basso o a rischio alto).

### ***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 MammaPrint dovrà corrispondere alle caratteristiche previste per la popolazione target come ad esempio carcinoma mammario, stadio iniziale e cellule tumorali di almeno il 30%.

I risultati dei test MammaPrint sono indicati per l'uso da parte del personale medico come profilo molecolare insieme a fattori clinico-patologici standard. Lo scopo del test non è quello di determinare l'esito della malattia.

Un esito di "rischio basso" del test MammaPrint non garantisce che la recidiva a distanza non si ripresenti entro cinque anni. Analogamente, un esito di "rischio alto" non garantisce che la recidiva a distanza si ripresenti realmente. L'esito del test dovrà essere utilizzato insieme ad altri fattori clinico-patologici.

### ***Procedura***

---

#### ***a) Selezione delle pazienti***

Una paziente è idonea ad essere sottoposta al test se di sesso femminile e con diagnosi di carcinoma mammario di stadio I, II o III con linfonodi negativi e positivi (fino a un massimo di 3 linfonodi positivi), con un tumore di dimensioni fino a 5 cm, indipendentemente dallo stato del recettore di estrogeni (ER+/-).

#### ***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 - TRF) può avvenire tramite il portale clienti online o un altro canale di comunicazione in cui Agendia registra tutte le informazioni relative al campione e alla paziente. Il TRF può essere utilizzato per una sola 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 del campione da parte di Agendia***

Vengono utilizzate sezioni di tessuto FFPE fornite dalle pazienti su vetrini o preparate utilizzando blocchi tumorali FFPE con 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***

L'analisi dei dati viene eseguita secondo l'algoritmo MammaPrint, che calcola l'indice MammaPrint determinando il profilo molecolare del campione (a rischio basso o a rischio alto). I campioni con un valore dell'indice MammaPrint superiore a 0 vengono classificati come a rischio basso, mentre i campioni con un valore inferiore o pari a 0 vengono classificati come a rischio alto.

L'indice MammaPrint di un campione può rientrare in un'area predefinita intorno alla soglia di classificazione tra un MPI di  $> -0,05$  e  $< 0,05$ , in cui l'esito MammaPrint ha un'accuratezza di classificazione  $< 90\%$  ma non inferiore al 50% (ovvero il campione limite).

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

### ***e) Rendicontazione***

Il professionista sanitario committente riceve un referto e un riepilogo dei risultati per ciascun test MammaPrint 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 MammaPrint 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.

MammaPrint 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**

---

L'esito MammaPrint viene fornito sotto forma di risultato binario e viene classificato come "a rischio basso" o "a rischio alto" di ricorrenza. Il profilo molecolare di un campione viene determinato calcolando l'Indice MammaPrint (MPI) su una scala da -1.000 a +1.000.

Come con qualsiasi altro test, anche il nostro test ha una soglia di classificazione stabilita. Per il MammaPrint, la soglia di basso ed alto rischio è stata fissata a zero per raggiungere la massima sensibilità possibile: i valori  $>0,000$  vengono classificati come "a rischio basso", mentre i valori  $\leq 0,000$  vengono classificati come "a rischio alto". L'accuratezza media complessiva dell'MPI è del 98,5%, con punteggi  $< 0,1685$  o  $> 0,168$  con un'accuratezza  $>99\%$ .

#### Valori MPI "limite"

Nonostante l'accuratezza tecnica del test MammaPrint sia estremamente elevata, i campioni con un valore MPI molto vicino alla soglia zero hanno una percentuale di accuratezza leggermente inferiore rispetto ai campioni più lontani dalla soglia. In particolare, intorno alla soglia dello zero, con un MPI  $> -0,05$  e  $< 0,05$ , detta anche "regione di confine", l'accuratezza del test scende al di sotto del 90%. Ad esempio, con un MPI di 0,04, c'è l'86% di certezza che il risultato MP rientri nell'intervallo positivo (a rischio basso) e il 14% di possibilità che rientri nell'intervallo negativo (a rischio alto). È importante notare che i campioni con valori MPI al di fuori della regione "i confine" hanno un'accuratezza media  $>99\%$ .

### **Caratteristiche di prestazione**

---

Tra le caratteristiche in termini di prestazioni analizzate per MammaPrint figurano l'accuratezza e la riproducibilità, l'intervallo segnalabile e la soglia di classificazione, 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 91,5% (n= 221) ed al 94,3% (n= 345), senza bias nei risultati MammaPrint tra i due tipi di tessuto. Il MammaPrint è stabile anche tra isolamenti differenti in cui non è stata riscontrata alcuna differenza significativa ( $p= 0,994/p= 0,290$ ), punti differenti e scanner differenti, dimostrando un'elevata accuratezza (97,3%), riproducibilità (96%) e ripetibilità (97,8%)<sup>(4)</sup>.

Inoltre, per l'FG-array, non è stata riscontrata alcuna differenza tra i risultati di isolamenti ripetuti di RNA in termini di accuratezza (98,47%), riproducibilità (97,73%) e ripetibilità (98,74%). La concordanza tra i risultati 8pack e FG-array con due set di dati separati è risultata essere pari al 98,52% (n= 135) ed al 94,27% (n = 698).

L'intervallo segnalabile dell'indice MammaPrint è stato impostato così da includere valori compresi tra -1,00 e + 1,00, mentre la soglia di classificazione dell'indice MammaPrint (MPI) è stata impostata a +0,0. Un MPI fino a 0,0 è considerato a rischio alto, mentre un MPI superiore a 0,0 è considerato a rischio basso <sup>(1, 2, 4)</sup>.

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 MammaPrint FFPE. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la contaminazione del DNA fino a 2,5 volte i livelli di fondo ed 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 MammaPrint. Nel complesso, i componenti tissutali interferenti non influenzano l'indice MammaPrint 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 <sup>(1)</sup>.

Per valutare il limite di rilevamento, sono stati confrontati i risultati del MammaPrint FFPE con diluizioni differenti. I risultati ottenuti sono 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 8,24 ng.

#### Validazione clinica

I risultati si basano sui dati pubblicati in precedenza per il profilo molecolare di 70 geni <sup>(1)</sup> nei carcinomi mammari. Le pazienti con esito positivo vengono classificate come "a rischio basso" (ovvero con nessuna metastasi a distanza in un arco temporale di almeno 5 anni). Le pazienti con esito meno favorevole vengono classificate come "a rischio alto" (ovvero con maggiore probabilità di sviluppare metastasi a distanza in un arco temporale di 5 anni). Viene fornito il valore numerico relativo all'indice MammaPrint.

MammaPrint è stato sviluppato utilizzando pazienti principalmente europee con linfonodi negativi non trattate con radioterapia adiuvante allo scopo di catturare la biologia del tumore primario in un profilo di espressione genica. <sup>(1,2)</sup> A gennaio 2013 sono stati pubblicati i risultati quinquennali dello studio prospettico osservazionale RASTER <sup>(4)</sup>. Questo studio d'impatto è stato "il primo del suo genere" ad essere incentrato sui biomarcatori in cui è stato eseguito e rendicontato il test MammaPrint Fresh su 427 pazienti affette da carcinoma mammario in fase iniziale di età compresa tra 18 e 61 anni, pT1 e pT2, linfonodi negativi, ER+/-, HER 2 +/- prima di prendere una decisione concordata tra medico e paziente di ricorrere a una terapia adiuvante. Le pazienti sono state trattate in conformità con le linee guida indicate da standard di prassi tenendo conto di tutti i fattori clinico-patologici rilevanti e dell'esito del test MammaPrint.

Successivamente, è stato eseguito un test MammaPrint anche sul tessuto FFPE di pazienti RASTER. I risultati del test MammaPrint sono stati confrontati utilizzando 345 nuove coppie di campioni e FFPE RASTER con dati di esito a 5 anni. Non tenendo conto di eventuali covariate diverse dal risultato del test MammaPrint delle pazienti, le pazienti classificate come "a rischio basso" da MammaPrint FFPE (71 delle quali trattate con terapia adiuvante e 108 non trattate con terapia adiuvante) hanno messo in luce una probabilità dell'1,3% (95% CI 0-3,1) di recidiva tumorale in un arco temporale di 5 anni <sup>(6)</sup>.

Le pazienti classificate come "a rischio alto" da MammaPrint FFPE (145 delle quali trattate con terapia adiuvante e 21 non trattate con terapia adiuvante) hanno messo in luce una probabilità dell'11,7% (95% CI 6,6-16,8) di recidiva tumorale in un arco temporale di 5 anni <sup>(6)</sup>.

MammaPrint è stato validato in modo indipendente in studi condotti su oltre 75.000 pazienti affette da carcinoma mammario con risultati pubblicati nelle principali riviste mediche e scientifiche a valutazione paritaria di livello

internazionale ed ha dimostrato di essere in grado di fornire informazioni indipendenti dalla valutazione del rischio clinico-patologico <sup>(6,7)</sup>.

### **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 test che troverà nel kit di raccolta di campioni. Maggiori informazioni in merito sono riportate nelle istruzioni per l'uso accluse a questo kit.

Se necessita di ulteriore assistenza, la invitiamo a contattarci all'indirizzo e-mail [customerservice@agendia.com](mailto:customerservice@agendia.com) o a telefonare al numero +31 (0)20 462 1510.

### **Bibliografia**

---

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. 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 et al. Lancet Oncol. 2021;22(4):476-488

### **Avvertenza:**

si prega di segnalare qualsiasi incidente grave relativo a MammaPrint 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

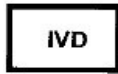
### **Dati relativi al costruttore**



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

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

**UDI-DI di base: 0850024841MammaprintK9**



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

MKT-517-V2

Data di pubblicazione: Febbraio 2025

**Modifiche della versione precedente**

Versione 2. Ampliamento della destinazione dell'uso, aggiornamento delle performance analitiche, della sezione dei riferimenti bibliografici, delle avvertenze e delle precauzioni

Prima pubblicazione: 3 novembre 2022