

Istruzioni per l'uso

Kit MammaTyper®, Ref CC01010

Scopo previsto:

Il kit MammaTyper® è un test diagnostico molecolare *in vitro* per la rilevazione quantitativa dello stato di espressione dell'mRNA dei geni *ERBB2* (*HER2*), *ESR1* (*ER*), *PGR* (*PR*) e *MKI67* (marcatore di proliferazione Ki-67) nel tessuto del cancro al seno umano.

Il kit MammaTyper® è indicato per la caratterizzazione del tessuto tumorale di pazienti donne con diagnosi di cancro al seno invasivo. Il test è stato convalidato per l'RNA totale estratto da campioni di tessuto FFPE da materiale di resezione o biopsia.

Il test è utilizzato per la sottotipizzazione molecolare del tessuto del cancro al seno nei tumori *tipo Luminal A*, *tipo Luminal B (HER2 negativo)*, *tipo Luminal B (HER2 positivo)*, *HER2 positivo (non luminale)* e *Triplo negativo (duttale)* (secondo la classificazione di St Gallen (2013)).

Il risultato del test MammaTyper® supporta la prognosi per il rischio del paziente di sviluppare metastasi a distanza e per la sopravvivenza globale.

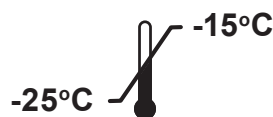
Il kit MammaTyper® è indicato per l'uso da parte dei medici insieme ad altri fattori clinicopatologici. MammaTyper® non è stato convalidato negli uomini, nelle donne incinte e nelle pazienti con un cancro al seno di tipo mucinoso, papillare, midollare o tubulare, quando non sono presenti metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali.



Cerca Biotech GmbH
Wiesenhüttenstraße 11,
60329, Francoforte sul Meno
Germania
Tel: +44-800-699-0772
E-mail: info@cercabiotech.com
Web: <http://www.cercabiotech.com>



CC01010



Indice

1.	Nome del prodotto	4
2.	Introduzione	4
3.	Riepilogo e spiegazione del test	6
3.1	Principio della procedura	6
4.	Reagenti	8
4.1	Materiali e reagenti forniti	8
4.2	Trasporto, stoccaggio e smaltimento	8
4.3	Materiali e reagenti richiesti ma non forniti	9
4.4	Attrezzatura necessaria	9
5.	Avvertenze e precauzioni	10
6.	Procedura	11
6.1	Materiale del campione	11
6.2	Preparazione per l'esecuzione del test	12
6.3	Procedura: preparazione delle reazioni PCR	13
7.	Metriche di controllo della qualità MammaTyper®	15
7.1	Validità dell'esecuzione e del campione	15
7.1.1	Criteri di validità LightCycler® 480 instrument II	16
7.1.2	Criteri di validità dell'analizzatore cobas z® 480	16
7.1.3	Criteri di validità Modulo Versant® kPCR AD	17
7.1.4	Criteri di validità del Sistema ABI 7500 Fast	18
7.1.5	Criteri di validità del sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ (BIO-RAD®)	19
7.1.6	Criteri di validità Sistema qPCR MX3000P (Agilent®)	19
8.	Risultati del test MammaTyper®	20
8.1	Calcolo dei risultati quantitativi del marcatore singolo	20
8.1.1	Valori soglia clinici specifici dello strumento (cut-off)	21
8.2	Definizione di sottotipi molecolari	23
9.	Limitazioni	24
10.	Valori attesi	25
10.1	Valore prognostico del test MammaTyper®	25
10.2	Confronto tra i valori misurati di MammaTyper® e IHC	25
11.	Caratteristiche delle prestazioni	29
11.1	Prestazioni tecniche	29
11.2	Performance cliniche	37
11.2.1	Studio FinHer MammaTyper®	37
11.2.2	Descrizione del 1° studio neoadiuvante MammaTyper®	42
12.	Conclusione	45
13.	Risoluzione dei problemi e correzione degli errori	46
14.	Letteratura	48
15.	Spiegazione dei simboli	49
16.	Stato di revisione	49
17.	Avviso legale	50



Importante: Leggere attentamente le presenti istruzioni per l'uso e familiarizzare con tutti i componenti e i flussi di lavoro del Kit MammaTyper® prima dell'uso. Il kit può essere utilizzato solo dal personale di laboratorio adeguatamente qualificato e addestrato.



Importante: Il Kit MammaTyper® deve essere usato solo se mantenuto costantemente sotto ghiaccio secco per l'intera spedizione. Se i componenti del kit non sono congelati all'arrivo, non utilizzare il kit e contattare il servizio clienti.

Avviso agli utenti

Ogni incidente grave che si è verificato in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è domiciliato l'utente e/o il paziente.

1. Nome del prodotto

MammaTyper®

2. Introduzione

Sulla base dell'espressione dell'mRNA dei quattro biomarcatori *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* e *MKI67*, il cancro al seno può essere suddiviso in almeno quattro diversi sottotipi: tumori di *tipo Luminal A*, *tipo Luminal B*, *HER2 positivo (non-luminale)* e *triplo negativo*. Inoltre, i tumori *tipo Luminal B* sono suddivisi in *tipo Luminal B (HER2 positivo)* e *tipo Luminal B (HER2 negativo)* secondo l'espressione di HER2.

Secondo la classificazione di St Gallen (2013) questi cinque sottotipi risultanti sono definiti come surrogati clinicopatologici, che sono associati a una raccomandazione terapeutica per ciascuno dei cinque sottotipi¹.

I sottotipi differiscono sia in termini di rischio complessivo, tempo e luogo di incidenza delle metastasi, nonché la risposta alle terapie sistemiche². Queste scoperte sono state incorporate nelle linee guida di trattamento e hanno cambiato la comprensione fondamentale del cancro al seno, che ora non è più interpretato come una sola malattia, ma come un gruppo di malattie molto diverse³. Di conseguenza, la determinazione del sottotipo è un passo essenziale per la valutazione del tumore e la scelta del metodo di trattamento più adatto. In linea di principio, cinque sottotipi possono essere differenziati sulla base della (sovra)espressione specifica di alcuni geni marcatori: Geni per i recettori ormonali (recettore degli estrogeni = *ESR1*, recettore del progesterone = *PGR*), la tirosina chinasi il recettore di crescita epidermico umano HER2 (*ERBB2*) e il marcatore di proliferazione Ki-67(*MKI67*). Perou et al. forniscono una sintesi dei sottotipi basati sull'espressione dell'mRNA dei marcatori⁴. Nei tumori luminali, la misurazione dell'attività di divisione cellulare serve a discriminare i tumori aggressivi *tipo Luminal B* da quelli meno aggressivi *tipo Luminal A*. Quindi i tumori *tipo Luminal B* hanno un rischio maggiore di sviluppare metastasi a distanza, considerando le misure terapeutiche oltre alla terapia anti-ormone.

Le procedure odierne per determinare l'espressione dei marcatori a livello proteico permettono solo una determinazione semi-quantitativa e spesso non riproducibile del livello di espressione dei marcatori⁵⁻¹¹.

Il test MammaTyper® consente una determinazione oggettiva, trasparente e riproducibile dell'espressione dei marcatori *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* ed *MKI67* a livello di mRNA attraverso un'analisi quantitativa e standardizzata dei quattro singoli marcatori e consente quindi una determinazione accurata del sottotipo molecolare di un campione tumorale sulla base dei limiti determinati per il test MammaTyper®.

Il risultato del test MammaTyper® è prognostico per il rischio del paziente di sviluppare metastasi a distanza e permette una prognosi di sopravvivenza globale (vedi capitolo 10, 11.1, 12.2.1).

La determinazione quantitativa dell'espressione dell'mRNA di *MKI67* in combinazione con i risultati degli altri tre marcatori aiuta a prevedere se la somministrazione di taxani in aggiunta alla chemioterapia adiuvante sia vantaggiosa per il paziente o se l'applicazione della chemioterapia neoadiuvante sia vantaggiosa per il paziente (vedi 12.2.1).

I risultati del test MammaTyper® supportano la scelta della terapia ottimale per il paziente secondo le raccomandazioni di St. Gallen. Per quanto riguarda la terapia sistemica, il trattamento dei cinque diversi sottotipi è proposto come segue^{1,3}.

1. La terapia endocrina è l'intervento più critico negli individui con il sottotipo di cancro al seno *tipo Luminal A*. È spesso usata da sola, anche se i citotossici possono essere somministrati in aggiunta in pazienti selezionati a seconda di altri fattori clinicopatologici come il coinvolgimento di quattro o più linfonodi patologici, la malattia di alto grado e/o la giovane età.
2. Per i pazienti con un tumore di sottotipo *tipo Luminal B (HER2 negativo)* è indicata una terapia endocrina, che il più delle volte è combinata con citotossici.
3. I pazienti con un sottotipo *tipo Luminal B (HER2 positivo)* sono trattati con terapie a base di anticorpi antiHER2. Questa terapia viene applicata in aggiunta al trattamento con citotossici e/o alla terapia endocrina.
4. I pazienti con un sottotipo *HER2 positivo (non-luminale)* sono trattati con terapie con anticorpi anti-HER2, in questo caso in combinazione con i soli citotossici.
5. I citotossici sono usati in tutti i casi di cancro al seno *triplo negativo (TNBC)*.

3. Riepilogo e spiegazione del test

3.1 Principio della procedura

Il MammaTyper® consente di determinare il livello di espressione di biomarcatori selezionati a livello di mRNA per mezzo della PCR quantitativa in tempo reale a trascrizione inversa (RT-qPCR).

In ciascuna delle tre miscele di test, due test (test = coppia di primer e sonda specifica per la rispettiva sequenza target) sono combinati (= duplex). La rilevazione simultanea dei due bersagli nei saggi duplex è realizzata utilizzando sonde di idrolisi con diversi fluorofori di marcatura; in ogni mix di saggi, la rilevazione è effettuata utilizzando FAM in un saggio e JOE nell'altro saggio. Le sonde di idrolisi sono modificate con il rispettivo colorante fluorescente alla 5' e un quencher all'estremità 3'. Il quencher sopprime la fluorescenza del colorante finché è in prossimità del colorante. Nel corso dell'amplificazione la sonda si lega alla sequenza bersaglio. A causa dell'attività esonucleasica della DNA polimerasi, la sonda legata viene degradata e il colorante e il quencher vengono separati. La fluorescenza risultante misurata alla fine di ogni ciclo è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto sintetizzato. Nei saggi di PCR in tempo reale che utilizzano sonde di idrolisi, il numero di cicli di PCR necessari per ottenere un segnale di fluorescenza maggiore del segnale di fondo viene utilizzato come misura del numero di molecole target esistenti all'inizio della reazione. Il ciclo di PCR in cui è possibile rilevare un segnale al di sopra del segnale di fondo viene definito ciclo di quantificazione (Cq). Nell'analisi di espressione relativa, la differenza dei valori Cq del test target e del test di riferimento (= ΔCq) è determinata per compensare le variazioni nella quantità di materiale di partenza RNA. Inoltre il valore ΔCq è compensato rispetto a un calibratore, per correggere le variazioni tra le esecuzioni e tra gli strumenti ($\Delta\Delta Cq$) per diversi strumenti di un produttore. I primer e le sonde specifiche per i marcatori sono selezionati in modo che non si verifichi alcuna amplificazione e/o rilevazione senza l'RNA del gene bersaglio o con sequenze o analiti indesiderati (ad es. DNA genomico), mentre il gene bersaglio di interesse viene rilevato in modo sensibile.

Utilizzando il kit MammaTyper® viene analizzato almeno un campione del paziente per corsa RT-qPCR. Inoltre, i controlli esterni sono analizzati all'interno di ogni esecuzione, che determinano la validità/invalidità dell'esecuzione. A questo scopo, nel kit MammaTyper® vengono forniti un RNA di controllo positivo che serve anche come calibratore (controllo positivo = PC) e acqua (per preparare le reazioni nonché un controllo negativo = NC). Ogni campione paziente/controllo viene analizzato con ciascun mix di test (1, 2 e 3). L'analisi viene eseguita in triplicato ottenendo $3 \times 3 = 9$ reazioni per campione/controllo. Mix di saggi 1 contiene i saggi per i biomarcatori *ERBB2*

(FAM) e *ESR1* (JOE), il mix di saggi 2 contiene il test per il biomarcatore *MKI67* (FAM) e il test di riferimento *B2M* (JOE) e il mix di saggi 3 contiene il test del biomarcatore *PGR* (FAM) e il test di riferimento *CALM2* (JOE). I due test di riferimento sono utilizzati per determinare se è presente una quantità sufficiente di analita (RNA) per un'analisi del campione del paziente. I campioni non validi non devono essere utilizzati per il calcolo dei risultati. Per i campioni validi (RNA sufficiente) l'analisi inizia con il calcolo del riferimento combinato (CombRef_{campione}, valore medio geometrico dei valori Cq mediano di *B2M* e *CALM2*). Il valore ΔCq specifico del marcatore_{campione} è quindi determinato dalla sottrazione di CombRef_{campione} dai quattro valori Cq mediano dei biomarcatori *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* e *MKI67*.

I valori ΔCq specifici del marcatore risultanti sono poi corretti utilizzando il calibratore, sottraendo un calibratore ΔCq_{PC} . Il CombRef_{PC} (CombRef_{PC}, valore medio geometrico dei valori di Cq mediano di *B2M* e *CALM2* del controllo positivo) viene sottratto dal rispettivo valore Cq del marcatore del controllo positivo, per calcolare il calibratore specifico del marcatore.

Il risultato è il valore $\Delta\Delta Cq$.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{campione}} - \Delta Cq_{PC}$$

con:

$$\Delta Cq_{\text{campione}} = (Cq \text{ mediana [Marcatore}_{\text{campione}}] - [\text{CombRef}_{\text{campione}}])$$

e:

$$\Delta Cq_{PC} = (Cq \text{ mediana [Marker}_{PC}] - [\text{CombRef}_{PC}])$$

I risultati finali (valori $40 - \Delta\Delta Cq$) sono ottenuti sottraendo i valori $\Delta\Delta Cq$ dal numero totale di cicli di PCR (40), in modo che i risultati del test siano positivamente correlati con l'espressione del marcatore, un formato che facilita l'interpretazione per la decisione clinica.

I valori $40 - \Delta\Delta Cq$ specifici del marcatore sono dicotomizzati in "positivo" o "negativo" sulla base di un valore soglia (cut-off) clinicamente validato. Inoltre, sono riportati i valori continui di ogni determinazione quantitativa dei marcatori. La combinazione dei risultati dei quattro marcatori (Pos/Neg) viene poi utilizzata per determinare il sottotipo molecolare del campione tumorale (vedi 9.4). Per la determinazione di un sottotipo è quindi necessario analizzare tutte e tre i mix di saggi in una sola esecuzione per ottenere i quattro valori $40 - \Delta\Delta Cq$ del campione.

4. Reagenti

4.1 Materiali e reagenti forniti

Ogni kit contiene i seguenti materiali, che sono sufficienti per 10 determinazioni (la scheda di sicurezza dei materiali è disponibile a richiesta per tutti i componenti).

1	Miscela enzimatica per RT-qPCR 260 µl, pronto all'uso, soluzione tamponata contenente trascrittasi inversa, DNA polimerasi, dNTP	Enzyme-Mix
2	Mix di saggi per la misurazione di <i>ERBB2</i> ed <i>ESR1</i> 90 µl, pronto all'uso, contiene oligonucleotidi di DNA e sonde qPCR	Assay-Mix 1
3	Mix di saggi per la misurazione di <i>MKI67</i> e <i>B2M</i> 90 µl, pronto all'uso, contiene oligonucleotidi di DNA e sonde qPCR	Assay-Mix 2
4	Mix di saggi per la misurazione di <i>PGR</i> e <i>CALM2</i> 90 µl, pronto all'uso, contiene oligonucleotidi di DNA e sonde qPCR	Assay-Mix 3
5	Controllo positivo 60 µl, pronto all'uso, Controllo positivo soluzione tamponata contenente RNA di controllo specifico (0,1 pg/µl)	Positive Control
6	Acqua priva di RNasi 350 µl, pronto all'uso	RNase-Free Water

Nota: Tutti i reagenti sono stati appositamente studiati per l'utilizzo con questo test. Per garantire il corretto funzionamento del test, i componenti non devono essere scambiati. I reagenti di un particolare lotto possono essere utilizzati solo con i reagenti dello stesso lotto del kit.

4.2 Trasporto, stoccaggio e smaltimento

Il Kit MammaTyper® viene spedito sotto ghiaccio secco. I reagenti del kit devono essere ancora congelati al ricevimento. Conservare tutti i reagenti al riparo dalla luce intensa tra -15 °C e -25 °C subito dopo il ricevimento. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Non esistono esperienze di deviazioni dalle condizioni di conservazione sopra indicate per i reagenti.

Dopo la prima apertura, il contenuto è stabile per 6 mesi nelle condizioni di conservazione specificate. I reagenti non devono essere utilizzati dopo 3 cicli di congelamento/scongelo.

Poiché i rifiuti dei campioni e delle soluzioni possono contenere rischi biologici, si raccomanda di trattarli come rifiuti medici smaltiti in modo coerente.

4.3 Materiali e reagenti richiesti ma non forniti

- Reagente per la decontaminazione da RNasi
- Piastre di analisi a 96 pozzetti specifiche per lo strumento e pellicole/coperchi sigillante
- Guanti monouso
- Contenitori di reazione da 1,5 ml privi di RNasi/DNasi
- Puntali per pipette privi di RNasi/DNasi con filtri per aerosol
- Rastrelliera di raffreddamento per piastre PCR

4.4 Attrezzatura necessaria

- Strumento per PCR in tempo reale in formato blocco (con 96 pozzetti) per la raccolta di dati per i seguenti o equivalenti coloranti: (1) FAM Ex495 Em520; (2) JOE Ex535 Em556. Prima di usare il kit MammaTyper[®], lo strumento PCR deve essere calibrato/qualificato secondo le specifiche del produttore.

NOTA: Il kit MammaTyper[®] è stato convalidato con i seguenti strumenti:

- LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche) con software LightCycler[®] 480 versione 1.5.1. o 1.5.0.
- Analizzatore Cobas z[®] 480 (Roche) con software LightCycler[®] 480 versione 1.5.1. o 1.5.0.
- Modulo Versant[®]kPCR AD (Siemens) con sistema molecolare Versant[®]kPCR Software AD versione 2.0
- Applied Biosystems[®] 7500 Fast (Dx) Real-Time PCR system (ABI 7500 Fast) (ThermoFisher Scientific) con SDS Software versione 1.4.0 o 2.3
- Sistema di rilevamento PCR in tempo reale-IVD CFX96[™] (BIO-RAD[®]) (articolo n. 185-5095-IVD)
- Sistema di rilevamento PCR in tempo reale-IVD CFX96[™] (BIO-RAD[®]) composto da
 - a) telaio: "telaio termociclatore C1000[™]" non-Touch (articolo n. 1841000) oppure Touch "telaio termociclatore C1000 Touch[™]" (articolo n. 1841100)
 - b) modulo ottico: "modulo di reazione ottico CFX96[™] per sistemi PCR in tempo reale" (articolo n. 1845097)

con software Bio-Rad CFX Manager[™] Versione 1.6 o Versione 3.1

- MX3000P (Agilent®) con software MxPro versione 4.10 e filtri FAM/SYBR® Green I (492 nm-516 nm) ed HEX/JOE/VIC (535 nm-555 nm)

Se si usa uno strumento diverso, il kit MammaTyper® deve essere convalidato dall'utente prima di determinare i risultati del paziente.

- Pipette per la preparazione di reazioni PCR
- Le pipette dispenser elettroniche sono altamente raccomandate per la distribuzione del master mix (7,5 µl) e dell'RNA modello (2,5 µl).
- Centrifugare la piastra per la raccolta del master mix e del campione di RNA sul fondo della piastra PCR a 96 pozzetti.

5. Avvertenze e precauzioni



Attenzione

1. Le sonde marcate in fluorescenza non possono essere esposte a periodi prolungati di forte irradiazione luminosa, al fine di evitare una riduzione dell'attività.
2. Si raccomanda la massima cautela per evitare la contaminazione di reagenti, campioni e PCR con materiale di controllo, altri prodotti di PCR o RNasi. Per ridurre il rischio di contaminazione, si raccomanda di allestire le PCR in un'area pre-PCR, separata dall'analisi dei campioni (post-PCR). Si raccomanda inoltre di decontaminare regolarmente le aree di lavoro, di utilizzare puntali per pipette resistenti agli aerosol con filtro per aerosol e di cambiare regolarmente i guanti.
3. Le piastre di reazione non devono essere aperte dopo una PCR.
4. I reagenti per questo test sono forniti nella diluizione ottimale. Non è consentita un'ulteriore diluizione dei reagenti, poiché ciò avrà un impatto diretto sulle prestazioni del test.
5. I campioni tumorali possono anche contenere tessuto non tumorale, che non mostra lo stesso profilo di espressione del tessuto tumorale. La qualificazione del tessuto per rilevare la presenza di un carcinoma invasivo da parte di un patologo è quindi necessaria.
6. Il test contiene un campione di controllo esogeno. Se il risultato del campione di controllo esogeno non è valido, l'intero dato di questa esecuzione di PCR deve essere scartato. L'analisi dei dati di questa esecuzione non è consentita.



Attenzione

1. Deviazioni dai tempi di incubazione, dalle temperature o dai metodi qui esplicitamente descritti possono compromettere i risultati del test.
2. Non utilizzare se l'imballaggio dei componenti del kit è danneggiato. Se l'imballaggio è difettoso o i componenti sono danneggiati, informare immediatamente il produttore.
3. Tutti i rifiuti devono essere smaltiti secondo le linee guida e i regolamenti locali.
4. Tutti i reagenti sono stati progettati appositamente per l'utilizzo con questo test. Per garantire il corretto funzionamento del test, i componenti non possono essere scambiati.

6. Procedura

Una serie analitica consiste in almeno un campione del paziente, che deve sempre essere analizzato insieme a un controllo positivo e a un controllo negativo (acqua). Il test contiene materiale reagente/di controllo sufficiente per un massimo di 10 determinazioni in un massimo di due esecuzioni. In una singola esecuzione possono essere testati un massimo di 8 campioni di pazienti, in due esecuzioni un massimo di 6 campioni di pazienti in totale insieme al controllo positivo e al controllo negativo (vedi Tabella 1). Ogni campione e controllo viene misurato usando ogni mix di saggi (1, 2 e 3) triplicato (3 x 3 = 9 reazioni).

Tabella 1: Numero di determinazioni del paziente possibili

Numero di pazienti		Numero Controlli (esecuzione A/B)	Determinazioni del numero
Esecuzione A	Esecuzione B		
1	5	2 / 2	10
2	4	2 / 2	
3	3	2 / 2	
8	0	2	

6.1 Materiale del campione

Il contenuto di tessuto del tumore invasivo deve essere almeno del 20% come stabilito da un patologo. Il kit MammaTyper® è stato sviluppato e convalidato per l'uso con RNA da campioni di tessuto di cancro al seno fissato

in formalina e incluso in paraffina (FFPE), che sono stati estratti e purificati utilizzando il kit di estrazione dell'RNA RNXtract® (REF CC01011, Cerca Biotech) secondo le istruzioni del produttore. Gli eluati provenienti da kit RNXtract® possono essere utilizzati direttamente nel test MammaTyper®.

Nota: il materiale dei campioni delle coorti di convalida è stato fissato con una soluzione di formalina neutra tamponata.

Nota: il kit MammaTyper® è stato convalidato con i seguenti metodi di estrazione dell'RNA pre analisi:

- Kit FFPE RNeasy® (articolo n. 73504, Qiagen)
- Kit per l'estrazione dell'RNA RNXtract® (articolo n. CC01011, Cerca Biotech)
- Kit per la preparazione del tessuto Versant® (articolo n. 10641922, Siemens Healthcare)

Se viene utilizzato un metodo di estrazione diverso, l'utilizzo del kit MammaTyper® deve essere convalidato dall'utente prima di determinare i risultati dei pazienti.

6.2 Preparazione per l'esecuzione del test

La configurazione degli strumenti di PCR in tempo reale deve essere eseguita prima dell'allestimento della reazione di PCR.

1. Decontaminare l'area di lavoro per evitare la contaminazione incrociata di campioni/reagenti e/o la contaminazione con enzimi o reagenti che degradano l'RNA.
2. Scongellare i reagenti di MammaTyper® sotto ghiaccio (proteggere da forti irradiazioni di luce). Dopo lo scongelamento, capovolgere delicatamente tutti i reagenti 2 o 3 volte per garantire una soluzione omogenea. Centrifugare brevemente i reagenti per raccogliere il materiale.
3. Poco prima dell'uso equilibrare la miscela enzimatica a temperatura ambiente per due minuti per ridurre la viscosità.
4. Preparare le piastre di analisi a 96 pozzetti specifiche per lo strumento e la pellicola/copertura di sigillatura.
5. Fornire ghiaccio per i reagenti e il rack di raffreddamento PCR per la piastra PCR a 96 pozzetti.

6.3 Procedura: preparazione delle reazioni PCR

IMPORTANTE: durante la preparazione, assicurare il raffreddamento continuo dei campioni/reagenti a 0°C!

- La determinazione dei marcatori viene eseguita in triplicato.
- Per un'analisi si deve preparare una master mix per ogni mix di saggi in recipienti di reazione da 1,5 ml. Un'analisi consiste in almeno 3 campioni (1 campione paziente e 2 controlli) o al massimo 10 campioni (8 campioni paziente e 2 controlli).
- In base al numero di campioni (= campioni di pazienti più due controlli), calcolare il volume necessario per ogni reagente come indicato nella Tabella 2:

7,5 µl x numero di campioni x 1,15 (incluso il 15% di margine di pipettaggio)

Tabella 2: Preparazione di un test MammaTyper®

Reagente	µl per reazione	µl per analisi in triplicato	Master mix [µl] per x campioni/controlli (incl. 15% di margine di pipettaggio)	
			3 campioni	10 campioni
Acqua	2,5	7,5	25,9	86,3
Mix di saggi	2,5	7,5	25,9	86,3
Miscela di enzimi	2,5	7,5	25,9	86,3
RNA	2,5	7,5	---	---
Totale	10,0	30,0	77,7	258,9

- Mentre si aggiunge la miscela enzimatica come ultimo componente della miscela master, pipettare su e giù 5-10 volte al fine di mescolare accuratamente i tre componenti (la miscela enzimatica è molto viscosa). Quindi agitare al Vortex la provetta per 3 s. Centrifugare brevemente per raccogliere il materiale. Mettere i master mix sotto ghiaccio
- Per evitare errori di pipettaggio e successivi scambi durante l'analisi dei dati, si raccomanda vivamente una disposizione standardizzata delle piastre. Esempio (vedi tabella 3): P1-8 = campioni di pazienti, PC = controllo positivo, NC = controllo negativo, i mix di saggi 1-3 sono mostrate in 3 colori.

Tabella 3: Disposizione della piastra consigliata per un test MammaTyper®; giallo: mix di saggi 1, blu: mix di saggi 2, rosso: mix di saggi 3; P1-8: da paziente 1 a 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	PC	PC	PC
B	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	PC	PC	PC
C	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	PC	PC	PC
D	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	---	---	---
E	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	---	---	---
F	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	NC	NC	NC
G	P7	P7	P7	P7	P7	P7	P7	P7	P7	NC	NC	NC
H	P8	P8	P8	P8	P8	P8	P8	P8	P8	NC	NC	NC

- Importante: assicurare un raffreddamento continuo a 0 °C durante l'allestimento della piastra. Utilizzare un rack di raffreddamento PCR per la piastra a 96 pozzetti. A temperature ambiente molto alte (>30 °C) durante l'allestimento di qPCR si possono usare successivamente due rack di raffreddamento.
- Pipettare 7,5 µl di master mix specifico per il test su un lato interno del pozzetto corrispondente della piastra PCR, se possibile, con una pipetta dispensatrice elettronica.
- Aggiungere 2,5 µl di eluato di RNA (campione), 2,5 µl di controllo positivo (PC) o 2,5 µl di acqua (NC) sull'altro lato interno dei pozzetti, se possibile, con una pipetta elettronica.
- Chiudere la piastra con la pellicola o le coperture appropriate.
- Centrifugare la piastra qPCR per almeno 10 secondi alla massima velocità in una centrifuga per piastre per raccogliere il materiale sul fondo dei pozzetti. Avviare l'esecuzione sullo strumento di PCR in tempo reale.

7. Metriche di controllo della qualità MammaTyper®

Prima di iniziare l'analisi dei dati dei campioni dei pazienti, si deve verificare che le metriche di controllo della qualità dell'esecuzione e del singolo campione siano soddisfatte.

7.1 Validità dell'esecuzione e del campione

- I sei valori Cq mediano del controllo positivo (Cq_{PC}) e del controllo negativo indicano se l'esecuzione è valida. I valori di $Cq_{mediano_{PC}}$ devono trovarsi in un determinato intervallo specifico dello strumento. Inoltre la distanza relativa del valore $Cq_{mediano_{PC}}$ di ogni singolo marcatore del controllo positivo dalla media dei valori di Cq mediano di tutti i marcatori rilevati nello stesso canale (FAM o HEX) è limitata agli intervalli indicati di seguito (specifici per ogni tipo di strumento).
- Il Cq mediano [$B2M_{campione}$] e il Cq mediano [$CALM2_{campione}$] dei campioni corretti con il riferimento combinato del controllo positivo ($CombRef_{PC}$) indicano se è presente sufficiente RNA per l'analisi.

Il riferimento combinato del controllo positivo ($CombRef_{PC}$) è calcolato formando la media dai valori di Cq mediano dei geni di riferimento *B2M* e *CALM2* del controllo positivo:

$$[CombRef_{PC}] = (Cq \text{ mediano } [B2M_{PC}] + Cq \text{ mediano } [CALM2_{PC}]) / 2$$

Importante: il calcolo dei valori $40-\Delta\Delta Cq$ può essere effettuato solo su campioni VALIDI

Note:

- I valori al di fuori dell'intervallo di accettazione (vedi tabelle seguenti) per i controlli positivi possono essere causati da errori durante la preparazione della qPCR, condizioni di qPCR errate, componenti del test non funzionali, impostazioni di soglia errate o errori di analisi dei dati. Se il controllo positivo e quindi l'esecuzione non sono validi, i campioni di questa esecuzione non devono essere analizzati.
- I valori al di fuori dell'intervallo di accettazione per i controlli negativi possono essere causati da errori durante la preparazione della qPCR, contaminazione dei componenti o contaminazione incrociata durante la preparazione. Se il controllo negativo e quindi l'esecuzione non sono validi, i campioni di questa esecuzione non devono essere analizzati.

7.1.1 Criteri di validità LightCycler® 480 instrument II

Validità dell'esecuzione

Tabella 4: Criteri di validità dell'esecuzione (1) per LightCycler® 480 Instrument II

			Controllo Negativo	Controllo Negativo
Mix di saggi	Canale	Test	Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>ESR1</i>	40,00	19,75-22,75
2	FAM	<i>MKI67</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>B2M</i>	40,00	19,75-22,75
3	FAM	<i>PGR</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>CALM2</i>	40,00	18,25-21,25

Calcolo dei criteri di validità dell'esecuzione (2):

Canale FAM: Cq mediano [marcatore] - Cq mediani [*ERBB2+PGR+MKI67*] / 3

Canale HEX: Cq mediano [marcatore] - Cq mediani [*ESR1+B2M+CALM2*] / 3

Tabella 5: Criteri di validità dell'esecuzione (2) per LightCycler® 480 Instrument II

Cq controllo positivo (Cq _{pc})					
Canale FAM			Canale HEX		
<i>ERBB2</i>	<i>PGR</i>	<i>MKI67</i>	<i>ESR1</i>	<i>B2M</i>	<i>CALM2</i>
-1,00 – 0,60	-0,70 – 0,90	-0,70 – 0,90	-0,30 – 1,30	-0,40 – 1,20	-1,80 – -0,20

Validità del campione

- Cq mediano [*B2M*_{campione}] - [CombRef_{PC}] > 8,1 **O**
Cq mediano [*CALM2*_{campione}] - [CombRef_{PC}] > 15,1 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [*B2M*_{campione}] - [CombRef_{PC}] ≤ 8,1 **E**
Cq mediano [*CALM2*_{campione}] - [CombRef_{PC}] ≤ 15,1 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

7.1.2 Criteri di validità dell'analizzatore cobas z® 480

Validità dell'esecuzione

Tabella 6: Criteri di validità dell'esecuzione (1) per l'analizzatore cobas z® 480

			Controllo Negativo	Controllo Negativo
Mix di saggi	Canale	Test	Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>ESR1</i>	40,00	20,75-23,75
2	FAM	<i>MKI67</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>B2M</i>	40,00	20,75-23,75
3	FAM	<i>PGR</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>CALM2</i>	40,00	19,25-22,25

Calcolo dei criteri di validità dell'esecuzione (2):

Canale FAM: Cq mediano [marcatore] - Cq mediani [*ERBB2+PGR+MKI67*] / 3

Canale HEX: Cq mediano [marcatore] - Cq mediani [*ESR1+B2M+CALM2*] / 3

Tabella 7: Criteri di validità dell'esecuzione (2) per l'analizzatore cobas z® 480

Cq controllo positivo (Cq _{pc})					
Canale FAM			Canale HEX		
<i>ERBB2</i>	<i>PGR</i>	<i>MKI67</i>	<i>ESR1</i>	<i>B2M</i>	<i>CALM2</i>
-1,00 – 0,60	-0,70 – 0,90	-0,70 – 0,90	-0,30 – 1,30	-0,40 – 1,20	-1,80 – -0,20

Validità del campione

- Cq mediano [*B2M*_{campione}] - [CombRef_{pc}] > 8,1 **O**
Cq mediano [*CALM2*_{campione}] - [CombRef_{pc}] > 15,1 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [*B2M*_{campione}] - [CombRef_{pc}] ≤ 8,1 **E**
Cq mediano [*CALM2*_{campione}] - [CombRef_{pc}] ≤ 15,1 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

7.1.3 Criteri di validità Modulo Versant® kPCR AD

Validità dell'esecuzione

Tabella 8: Criteri di validità dell'esecuzione (1) per il modulo Versant®kPCR AD

			Controllo Negativo	Controllo Negativo
Mix di saggi	Canale	Test	Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40,00	18,00-21,00
	HEX	<i>ESR1</i>	40,00	18,00-21,00
2	FAM	<i>MKI67</i>	40,00	18,00-21,00
	HEX	<i>B2M</i>	40,00	18,50-21,50
3	FAM	<i>PGR</i>	40,00	18,00-21,00
	HEX	<i>CALM2</i>	40,00	17,00-20,00

Calcolo dei criteri di validità dell'esecuzione (2):

Cq mediano [marcatore] - Cq mediani [ERBB2+ESR1+PGR+MKI67] / 4

Tabella 9: Eseguire i criteri di validità (2) per il modulo Versant®kPCR AD. Cq mediano del marcatore singolo meno la media dei valori Cq mediani [ERBB2+ESR1+PGR+MKI67]

Cq controllo positivo (Cq _{PC})					
ERBB2	ESR1	PGR	MKI67	B2M	CALM2
-0,80 – 0,80	-0,80 – 0,80	-0,80 – 0,80	-0,80 – 0,80	-0,40 – 1,20	-1,70 – -0,10

Validità del campione

- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 7,2 **O**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 14,1 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 7,2 **E**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 14,1 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

7.1.4 Criteri di validità del Sistema ABI 7500 Fast

Validità dell'esecuzione

Tabella 10: Criteri di validità dell'esecuzione del sistema ABI 7500 Fast

Mix di saggi	Canale	Test	Controllo Negativo	Controllo Negativo
			Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	ERBB2	40,00	17,50-20,50
	HEX	ESR1	40,00	16,50-19,50
2	FAM	MKI67	40,00	17,50-20,50
	HEX	B2M	40,00	17,50-20,50
3	FAM	PGR	40,00	17,50-20,50
	HEX	CALM2	40,00	16,00-19,00

Validità del campione

- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 8,5 **O**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 14,5 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 8,5 **E**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 14,5 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

7.1.5 Criteri di validità del sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ (BIO-RAD®)

Validità dell'esecuzione

Tabella 11: Criteri di validità dell'esecuzione del sistema CFX96™

			Controllo Negativo	Controllo Negativo
Mix di saggi	Canale	Test	Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40,00	19.40-22.40
	HEX	<i>ESR1</i>	40,00	19.40-22.40
2	FAM	<i>MKI67</i>	40,00	19.40-22.40
	HEX	<i>B2M</i>	40,00	19.40-22.40
3	FAM	<i>PGR</i>	40,00	19.40-22.40
	HEX	<i>CALM2</i>	40,00	18.20-21.20

Validità del campione

- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 8,1 **O**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 14,1 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 8,1 **E**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 14,1 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

7.1.6 Criteri di validità Sistema qPCR MX3000P (Agilent®)

Validità dell'esecuzione

Tabella 12: Criteri di validità dell'esecuzione del sistema MX3000P

			Controllo Negativo	Controllo Negativo
Mix di saggi	Canale	Test	Cq mediano	Cq mediano
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40.00	18.90-21.90
	HEX	<i>ESR1</i>	40.00	18.40-21.40
2	FAM	<i>MKI67</i>	40.00	18.90-21.90
	HEX	<i>B2M</i>	40.00	18.90-21.90
3	FAM	<i>PGR</i>	40.00	18.90-21.90
	HEX	<i>CALM2</i>	40.00	17.20-20.20

Validità del campione

- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 8,3 **O**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] > 14,3 significa che il campione non è valido (quantità di materiale insufficiente per l'analisi)
- Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 8,3 **E**
Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] - [CombRef_{PC}] ≤ 14,3 significa che il campione è valido (quantità di materiale sufficiente per l'analisi)

8. Risultati del test MammaTyper®

Il test MammaTyper® fornisce valori quantitativi di espressione di mRNA per *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* ed *MKI67* come valori 40- $\Delta\Delta Cq$ su una scala continua, nonché lo stato dei geni marcatori come categoria (positivo o negativo). Nell'analisi retrospettiva dei campioni del FinHer-trial (vedi capitolo 12.2.1) i valori Cq 40- $\Delta\Delta$ variavano da 36 a 46 per *ERBB2*, da 33 a 45 per *ESR1*, da 26 a 42 per *PGR*, e da 32 a 40 per *MKI67*. Sulla base dei risultati del singolo marcatore, il sottotipo molecolare secondo la classificazione di St Gallen (2013) è mostrato nella Tabella 13. I cut-off dei singoli marcatori sono stati convalidati clinicamente in un'analisi prospettica e retrospettiva di una coorte di pazienti con cancro al seno nell'ambito di una valutazione della performance clinica utilizzando materiale FFPE. È stato confermato che il sottotipo molecolare di un tumore al seno è direttamente correlato alla prognosi.

Tabella 13: Risultati e valori di uscita del test MammaTyper®

Risultato	Valori dichiarati
Risultati quantitativi del singolo marcatore	Valori 40-DDCq costanti per <i>ERBB2</i> , <i>ESR1</i> , <i>PGR</i> , <i>MKI67</i>
Risultati dicotomizzati del singolo marcatore	Positivo o negativo per <i>ERBB2</i> , <i>ESR1</i> , <i>PGR</i> , <i>MKI67</i>
Definizione surrogata di St. Gallen (2013)	<i>Tipo Luminal A</i> <i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i> <i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i> <i>HER2 positivo (non-luminale)</i> <i>Triplo negativo (duttale)</i> Non definito secondo la classe di St. Gallen. 2013
Informazioni prognostiche: previsione del rischio del paziente di sviluppare metastasi a distanza e della sopravvivenza globale	Risultati del marcatore singolo Sottotipo

8.1 Calcolo dei risultati quantitativi del marcatore singolo

I risultati del marcatore singolo di MammaTyper® sono calcolati per ogni campione come segue:

Prima di iniziare il calcolo impostare tutte le reazioni, in cui non è stato rilevato alcun segnale, a $Cq = 40$ (identificato dal valore mancante in LightCycler® 480 II / analizzatore cobas z® 480, 'No cT' in nel modulo Versant® kPCR AD e "Indeterminato" nel file del risultato di ABI 7500 Fast, "NaN" su software CFX96™ Versione 3.1, valore mancante su software CFX96™ Versione 1.6 e "No Ct" su MX3000P).

- Prima vengono determinati i valori di Cq mediano dalle 3 misurazioni in triplicato per ogni campione/controllo e test. Si ottengono 6 valori di Cq mediano per campione/controllo:
 - Cq mediano [*ERBB2*]
 - Cq mediano [*ESR1*]
 - Cq mediano [*MKI67*]
 - Cq mediano [*B2M*]
 - Cq mediano [*PGR*]
 - Cq mediano [*CALM2*]

Il riferimento combinato (CombRef) è calcolato per ogni campione/controllo dai valori di Cq mediano dei geni di riferimento *B2M* e *CALM2* formando il valore medio.

Un valore CombRef è ottenuto per ogni campione (CombRef_{campione}) e controllo positivo (CombRef_{PC}):

- $[CombRef] = (Cq \text{ mediano } [B2M] + Cq \text{ mediano } [CALM2]) / 2$

Il CombRef serve ora a calcolare i valori ΔCq e $40-\Delta\Delta Cq$ per i 4 geni target:

$$40-\Delta\Delta Cq = 40 - (\Delta Cq_{\text{campione}} - \Delta Cq_{\text{PC}})$$

- $40-\Delta\Delta Cq [ERBB2] = 40 - ((Cq \text{ mediano } [ERBB2]_{\text{campione}}] - [CombRef_{\text{campione}}]) - (Cq \text{ mediano } [ERBB2]_{\text{PC}}] - [CombRef_{\text{PC}}])$
- $40-\Delta\Delta Cq [ESR1] = 40 - ((Cq \text{ mediano } [ESR1]_{\text{campione}}] - [CombRef_{\text{campione}}]) - (Cq \text{ mediano } [ESR1]_{\text{PC}}] - [CombRef_{\text{PC}}])$
- $40-\Delta\Delta Cq [PGR] = 40 - ((Cq \text{ mediano } [PGR]_{\text{campione}}] - [CombRef_{\text{campione}}]) - (Cq \text{ mediano } [PGR]_{\text{PC}}] - [CombRef_{\text{PC}}])$
- $40-\Delta\Delta Cq [MKI67] = 40 - ((Cq \text{ mediano } [MKI67]_{\text{campione}}] - [CombRef_{\text{campione}}]) - (Cq \text{ mediano } [MKI67]_{\text{PC}}] - [CombRef_{\text{PC}}])$

8.1.1 Valori soglia clinici specifici dello strumento (cut-off)

LightCycler® 480 instrument II e analizzatore cobas z® 480 (Roche)

Tabella 14: Cut-off per i risultati del marcatore singolo MammaTyper® per LightCycler® 480 instrument II e analizzatore cobas z® 480

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 41,10	≥ 41,10
<i>ESR1</i>	< 38,00	≥ 38,00
<i>PGR</i>	< 35,50	≥ 35,50
<i>MKI67</i>	< 35,90	≥ 35,90

Modulo Versant®kPCR AD (Siemens)

Tabella 15: Cut-off per i risultati del marcatore singolo MammaTyper® per il sistema Versant® kPCR

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 41,20	\geq 41,20
<i>ESR1</i>	< 38,40	\geq 38,40
<i>PGR</i>	< 35,60	\geq 35,60
<i>MK167</i>	< 35,70	\geq 35,70

Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)

Software ABI 7500 Fast versione 1.4.0

Tabella 16: Cut-off per i risultati del marcatore singolo MammaTyper® per Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (Software versione 1.4.0)

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 41,00	\geq 41,00
<i>ESR1</i>	< 37,90	\geq 37,90
<i>PGR</i>	< 35,30	\geq 35,30
<i>MK167</i>	< 35,00	\geq 35,00

Software ABI 7500 Fast versione 2.3

Tabella 17: Cut-off per i risultati del singolo marker MammaTyper® per Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (Software versione 2.3)

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 40,90	\geq 40,90
<i>ESR1</i>	< 37,90	\geq 37,90
<i>PGR</i>	< 35,30	\geq 35,30
<i>MK167</i>	< 34,90	\geq 34,90

Sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96™ (BIO-RAD®)

Tabella 18: Cut-off dei risultati del marcatore singolo MammaTyper® per CFX96™ (software Bio-Rad CFX Manager™ Versione 1.6 e 3.1)

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 41.10	\geq 41.10
<i>ESR1</i>	< 38.20	\geq 38.20
<i>PGR</i>	< 35.40	\geq 35.40
<i>MK167</i>	< 36.30	\geq 36.30

Sistema qPCR MX3000P (Agilent®)

Tabella 19: Cut-off dei risultati del marcatore singolo MammaTyper® per MX3000P (Agilent®) MxPro (Versione software 4.10)

	Negativo (40- $\Delta\Delta Cq$)	Positivo (40- $\Delta\Delta Cq$)
<i>ERBB2</i>	< 41.10	\geq 41.10
<i>ESR1</i>	< 38.00	\geq 38.00
<i>PGR</i>	< 35.20	\geq 35.20
<i>MK167</i>	< 35.50	\geq 35.50

8.2 Definizione di sottotipi molecolari

In base alla combinazione dei risultati dei quattro biomarcatori (Pos/Neg), il campione viene assegnato a uno dei cinque sottotipi molecolari secondo la classificazione di St Gallen (2013)³.

Tabella 20: Traduzione dei risultati del marcatore singolo MammaTyper® in sottotipi molecolari secondo la classificazione di St Gallen (2013)

<i>ERBB2</i>	<i>ESR1</i>	<i>PGR</i>	<i>MK167</i>	Sottotipi di St Gallen
Neg	Pos	Pos	Neg	<i>Tipo Luminal A</i>
Pos	Pos	Pos / Neg	Pos / Neg	<i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i>
Neg	Pos	Pos / Neg	Pos / Neg	<i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i>
Pos	Neg	Neg	Pos / Neg	<i>HER2 positivo (non-luminale)</i>
Pos / Neg	Neg	Pos	Pos / Neg	<i>Non definito</i>
Neg	Neg	Neg	Pos / Neg	<i>Triplo negativo (duttale)</i>

I “sottotipi” non definiti secondo St Gallen (2013) si basano sul presupposto che una combinazione che mostra un risultato *ESR1* (*ER*) negativo ma un *PGR* (*PR*) positivo non è possibile^{1,3}. In un'indagine epidemiologica è stato trovato il 2,4% di tumori *ER* negativo/*PR* positivo in una coorte americana di cancro al seno¹². Questi sottotipi sono stati trovati anche in due studi di valutazione della performance clinica MammaTyper® in alcuni casi (3,5%).

9. Limitazioni

- Il test MammaTyper® è stato sviluppato e convalidato per la rilevazione quantitativa dello stato di espressione dell'mRNA dei geni *ERBB2* (*HER2*), *ESR1* (*ER*), *PGR* (*PR*) e *MKI67* (marcatore di proliferazione Ki-67) nel tessuto del cancro al seno umano utilizzando RNA purificato derivato da tessuto fissato in formalina e conservato in paraffina. L'adeguatezza di altri tipi di campioni o di fissatori non è stata convalidata.
- I dati di performance del test MammaTyper® sono stati convalidati secondo le istruzioni per l'uso e utilizzando esclusivamente i componenti contenuti nel kit. Modifiche di qualsiasi tipo possono alterare le prestazioni del test.
- Il congelamento e lo scongelamento frequenti devono essere evitati (al massimo 3 volte).
- I dati di performance del test MammaTyper® sono stati determinati per donne in pre e postmenopausa con linfonodi negativi o positivi, che presentavano un cancro al seno in fase iniziale positivo o negativo per il recettore ormonale e/o HER2-positivo o negativo. Queste pazienti sono state trattate con terapia chemioendocrina adiuvante in combinazione con la terapia anti-HER2 (studio MammaTyper®FinHer, 13.2.1) o con terapia chemioendocrina neoadiuvante (studio MammaTyper® 1° studio neoadiuvante, 13.2.2). La performance del MammaTyper® in relazione ad altri regimi terapeutici o popolazioni di pazienti non è stata ancora determinata.
- Le sezioni FFPE da utilizzare con l'analisi di espressione genica MammaTyper® devono mostrare un contenuto di cellule tumorali di almeno il 20%.
- Utilizzando una quantità insufficiente di RNA o RNA di qualità insufficiente come materiale di partenza, il rispettivo risultato MammaTyper® potrebbe non essere valido secondo i criteri di validità definiti.

10. Valori attesi

I seguenti dati sono stati estratti dalle analisi statistiche dello studio FinHer MammaTyper® e del 1o studio neoadiuvante.

10.1 Valore prognostico del test MammaTyper®

I pazienti identificati come aventi un sottotipo *tipo Luminal A* utilizzando il test MammaTyper® hanno dato luogo a una differenza significativa per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia a distanza (DDFS) e la sopravvivenza globale (OS) rispetto ad altri sottotipi (vedi 12.2.1)¹³.

L'accurata assegnazione dei pazienti ai sottotipi molecolari *tipo Luminal A* e *tipo Luminal B (HER2 negativo)* utilizzando MammaTyper® è dimostrato inoltre confrontando la sopravvivenza libera da malattia a distanza e la sopravvivenza globale di *tipo Luminal B (HER2 negativo)* trattati con docetaxel/5-fluorouracile, epidoxorubicina e ciclofosfamide (FEC) o vinorelbina/FEC¹³.

I pazienti *tipo Luminal B (HER2 negativo)* hanno mostrato un tasso più alto di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni e un tasso più alto di sopravvivenza globale se sono stati trattati con docetaxel invece di vinorelbina in aggiunta alla chemioterapia FEC (Tabella 21 e Tabella 27).

Tabella 21: Previsione del beneficio del docetaxel per quanto riguarda la sopravvivenza globale (OS) a 5 anni secondo il metodo MammaTyper® in tutti i pazienti dello studio FinHer MammaTyper®. CI: intervallo di confidenza; Doc: Docetaxel; HR: Rapporto di rischio; Vin: Vinorelbine

5 anni di OS	Doc/FEC	Vin/FEC	HR	valore p	95%-CI (HR)
<i>Tipo Luminal A</i>	96%	98%	2,10	0,393	0,38-11,51
<i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i>	97%	89%	0,31	0,012	0,12-0,77
<i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i>	91%	92%	0,93	0,914	0,23-3,70
<i>HER2 positivo</i>	85%	89%	1,31	0,665	0,38-4,49
<i>Triplo negativo</i>	86%	82%	0,80	0,673	0,29-2,25

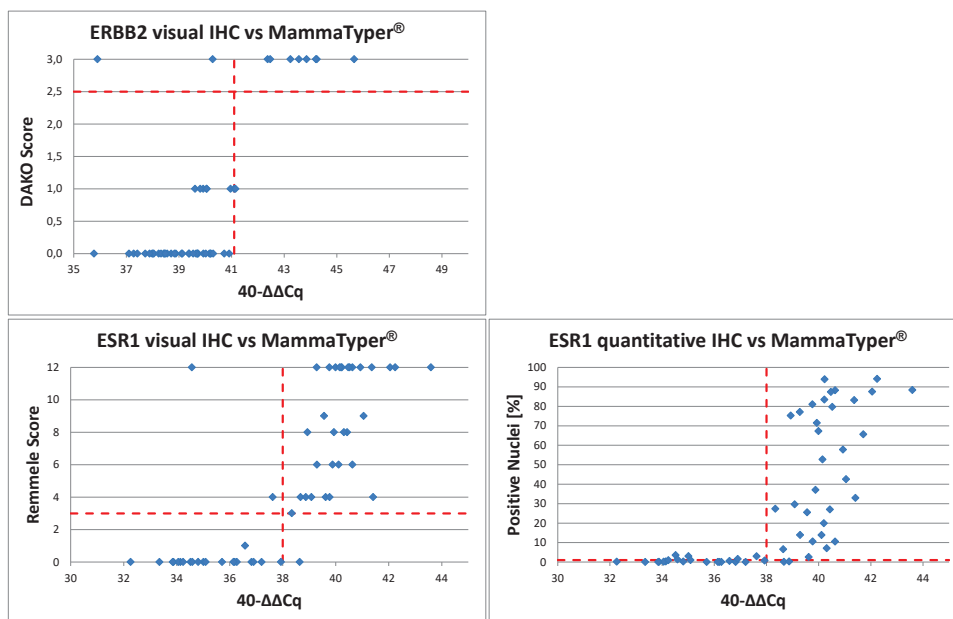
10.2 Confronto tra i valori misurati di MammaTyper® e IHC

Nel corso del 1° studio neoadiuvante MammaTyper® (vedere 12.2.2), è stato confrontato l'accordo delle misure di *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* e *MKI67* secondo i cut-off predefiniti con i valori di una quantificazione visiva e automatizzata di ER, PR e Ki-67 utilizzando l'IHC centrale in 55 biopsie core^{14,15}.

Il confronto tra *ESR1* e *PGR* con la quantificazione visiva del patologo di riferimento ha portato a un ottimo accordo generale (OPA) del 92%, 93% e 91% rispettivamente. L'accordo percentuale positivo (PPA) era dell'80%, 94% e 92% e l'accordo percentuale negativo (NPA) era del 95%, 91% e 90% per *ERBB2*, *ESR1* e *PGR*. I valori di espressione erano correlati con un'alta significatività ($p < 0,0001$), con valori kappa di 0,66, 0,85 e 0,82 per *ERBB2*, *ESR1* e *PGR*. Da *MKI67/Ki-67* era positivo per tutti i campioni, questo marcatore è stato ignorato per l'analisi dell'accordo^{14,15}.

Nel confronto tra i risultati dell'espressione dell'RNA di *ESR1* e *PGR* e i risultati della quantificazione automatica della stessa colorazione IHC del patologo di riferimento, è stato osservato in parte un OPA ancora più elevato, rispettivamente dell'88% e del 95%. Il PPA era del 86% e del 96%, l'NPA era del 89% e del 93% per *ESR1* e *PGR* rispettivamente. I valori di espressione erano correlati con un'alta significatività ($p < 0,0001$) con valori di kappa di 0,89 e 0,93 per *ESR1* e *PGR*. La quantificazione automatica non era applicabile per *HER2*^{14,15}.

I grafici a dispersione (Figura 1) illustrano la rappresentazione a grana fine dei valori $40-\Delta\Delta Cq$ MammaTyper[®] che possono risolvere sottili differenze all'estremità alta e a quella bassa dell'intervallo di espressione genica. L'IHC quantitativo per ER e PR ha prestazioni comparabili per i valori positivi; tuttavia, sia il vIHC sia il qIHC non riescono a fornire alcuna granularità all'estremità inferiore della gamma di espressione della proteina.



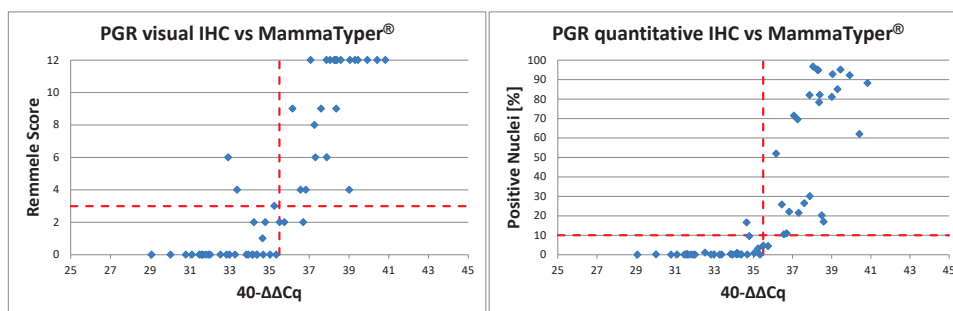


Figura 1: Analisi a grafici a dispersione dei valori continui di espressione dell'mRNA ($40\Delta\Delta Cq$) di *ERBB2* e dei recettori ormonali *ESR1* e *PGR* (MammaTyper[®]) rispetto all'espressione proteica determinata con stima semiquantitativa (sinistra; vIHC; punteggio DAKO per HER2 o punteggio Remmele per ER e PR) o con quantificazione automatizzata (destra; qIHC; percentuale di nuclei positivi) in materiale da agobiopsia derivato dal 1° studio neoadiuvante (vedere 12.2.2). I cut-off predefiniti sono indicati come linee rosse.

Accordo dei risultati MammaTyper[®] e IHC (FinHer)

Lo studio FinHer MammaTyper[®] (vedere 12.2.1) mostra un alto accordo per tre dei quattro marcatori dei risultati MammaTyper[®] dicotomici con i risultati IHC (IHC decentralizzato nell'ambito dello studio FinHer). Questi sono *ESR1/ER*, *PGR/PR* ed *ERBB2/HER2*.

MKI67 determinato da MammaTyper[®] ha mostrato una correlazione significativa ($p < 0,0001$) e una concordanza moderata con i risultati di Ki-67 IHC ($\kappa = 0,45$). La percentuale complessiva di accordo (OPA) è stata del 75% con una percentuale di accordo positivo (PPA) del 91% e una percentuale di accordo negativo (NPA) del 51%. La determinazione *ERBB2* da MammaTyper[®] ha mostrato una buona concordanza con HER2 IHC ($\kappa = 0,79$; $p < 0,0001$). L'accordo complessivo è stato del 93% con un PPA dell'83% e un NPA del 95%. La determinazione *ESR1* da MammaTyper[®] ha mostrato una buona concordanza con ER IHC ($\kappa = 0,80$; $p < 0,0001$). L'accordo complessivo è stato del 92% con un PPA dell'96% e un NPA del 81%. La determinazione *PGR* da MammaTyper[®] ha anche mostrato una buona concordanza con PR IHC ($\kappa = 0,64$; $p < 0,0001$). L'accordo complessivo è stato dell'83% con un PPA del 93% e un NPA del 69%¹³.

Valutazione dei casi discordanti *MKI67/Ki-67* secondo l'esito clinico (FinHer)

L'accordo sostanzialmente inferiore tra il metodo RT-qPCR e IHC per *MKI67* rispetto agli altri marcatori può essere spiegato dalla determinazione semi-quantitativa e nella determinazione decentrata del trial FinHer di Ki-67 utilizzando IHC (alto grado di variabilità della determinazione Ki-67^{7,8}).

Il diagramma a dispersione in Figura 2 illustra la correlazione delle misure singole *MKI67/Ki-67* e mostra i casi discrepanti (evidenziati in blu o rosso).

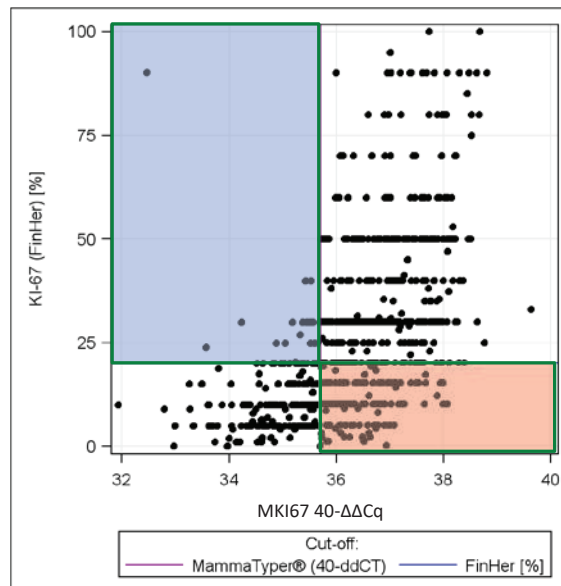


Figura 2: Il diagramma a dispersione che mostra la correlazione dell'espressione dell'mRNA di *MKI67* (40- $\Delta\Delta Cq$) determinata da MammaTyper® con l'espressione proteica determinata da IHC. Il cut-off per *MKI67* riflette il cut-off di Ki67 del 20% di St. Gallen per IHC. I casi discordanti sono evidenziati in blu o rosso.

Il risultato clinico dei pazienti con discrepanza *MKI67*/Ki-67 è stato analizzato al fine di indagare più da vicino i risultati discrepanti dei due metodi di misura *MKI67*/Ki-67 e per dimostrare il valore prognostico della determinazione *MKI67* di MammaTyper® rispetto all'IHC. I risultati di MammaTyper®- e IHC sono stati confrontati da DDFS dei casi discordanti. Per ragioni cliniche la sopravvivenza libera da malattia a distanza è stata analizzata solo nei pazienti con tumori *ESR1* positivi¹³. Nei casi discordanti, una sopravvivenza libera da malattia a distanza ovviamente migliore potrebbe essere mostrata se *MKI67* era negativo, una peggiore sopravvivenza libera da malattia a distanza è stata osservata se *MKI67* era positivo determinato da MammaTyper®. A causa del basso tasso di eventi questo potrebbe essere mostrato come una tendenza. Questo risultato era in accordo con la prognosi negativa per l'espressione di *MKI67* alta determinata con casi concordanti della stessa coorte di studio¹³.

Al contrario, esattamente la conclusione opposta si trarrebbe per l'espressione di Ki-67 determinata da IHC nei casi discrepanti, dove alte percentuali di nuclei colorati positivamente Ki-67 erano associati a un migliore esito clinico. Questi risultati indicano che *MKI67* come determinato da MammaTyper® è superiore alla determinazione della proteina Ki-67 tramite IHC per quanto riguarda il valore prognostico¹³.

11. Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Prestazioni tecniche

Precisione analitica e riproducibilità

Per convalidare la riproducibilità del test MammaTyper[®], sono stati eseguiti due studi su due piattaforme qPCR compatibili. Il primo studio è stato condotto utilizzando quattro dispositivi LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche) utilizzando un pool di RNA estratto da tessuto del cancro al seno FFPE.

Il secondo studio è stato progettato per indagare la combinazione di fattori preanalitici e le variazioni tra le piattaforme qPCR. È stato condotto utilizzando tre dispositivi Versant[®]kPCR (Siemens) e un LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche). Questo studio ha utilizzato sezioni di tessuto di cancro al seno FFPE come materiale di partenza per l'analisi.

Ogni campione è stato testato in triplicato durante ogni esecuzione insieme ai controlli positivi e negativi specificati. Per l'estrazione è stata utilizzata una sezione di tessuto di 10 µm di spessore, indipendentemente dalle dimensioni o dalla proporzione del tumore. I risultati dei due studi sono stati presentati separatamente qui in base alla piattaforma qPCR per una migliore visione d'insieme.

Studio 1

Questo studio 1 di precisione è stato condotto da due operatori su quattro dispositivi LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche) in tre siti, per valutare le prestazioni analitiche. I campioni erano eluati di RNA da sette campioni di cancro al seno FFPE disponibili in commercio aggregati in ogni caso e un campione di RNA di riferimento disponibile in commercio (RNA aggregato da varie linee cellulari di cancro). I campioni sono stati selezionati per comprendere l'intera gamma di livelli di espressione clinicamente previsti di *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* e *MKI67* (compresi i valori vicini ai valori soglia (cut-off)). Ogni campione è stato elaborato durante sei esecuzioni RT-qPCR indipendenti per dispositivo, con 2 misurazioni condotte al giorno (3 giorni in totale).

Studio 2

Il secondo studio di precisione comparativo MammaTyper[®] è stato condotto in tre siti utilizzando sezioni consecutive dello stesso blocco tumorale FFPE. Il materiale di partenza erano sezioni di 15 tessuti di cancro al seno FFPE disponibili in commercio e uno clinico (15 carcinomi duttali e 1 carcinoma lobulare). (I campioni includevano i quattro sottotipi MammaTyper[®]. L'intero tessuto FFPE è stato sezionato nel sito 1, randomizzato e inviato agli altri due siti di test. Ogni campione di tessuto è stato trattato durante tre cicli di 4 giorni, iniziando con l'estrazione il giorno 1 e seguito da tre misurazioni RT-qPCR in giorni diversi (giorno 2-4). Gli esperimenti sono stati eseguiti da un operatore per sito utilizzando un dispositivo Versant[®]kPCR (Siemens) e un singolo lotto di RNXtract[®] e/o MammaTyper[®].

Per studiare la precisione di variabili simili, sei cicli aggiuntivi di estrazione/qPCR sono stati eseguiti dallo stesso operatore nel sito 1, due con lotti MammaTyper® diversi, uno con un altro lotto RNXtract® e tre su un dispositivo qPCR LightCycler® 480 instrument II (Roche).

Risultati

La tabella 22 mostra le variazioni dei saggi (nell'ambito di un dispositivo e tra dispositivi, per i singoli marcatori) osservate per il LightCycler® 480 II negli studi 1 e 2. Le deviazioni standard (SD) specifiche del marcatore e complessive variavano da 0,14 a 0,2 Cq (variazione tra i siti) e da 0,05 a 0,52 Cq (variazione tra le estrazioni) rispettivamente per gli studi 1 e 2. La variabilità biologica, ossia la varianza tra diverse estrazioni, era quasi identica o addirittura inferiore rispetto alla variabilità tra diverse aliquote dello stesso RNA-eluito (intra-estrazione). La varianza è stata distribuita uniformemente sulle misurazioni dei quattro marcatori analizzati, indicando prestazioni del test comparabili.

Tabella 22: Deviazioni standard dei valori $40-\Delta\Delta Cq$ (SD) con intervalli di confidenza al 95% (CI), secondo varie fonti di variazione analitica (LightCycler® 480 Instrument II, Roche)

Light-Cycler® 480 II		Studio 1							Studio 2	
		Tra siti	Tra esecuzioni	Tra esecuzioni				Intra-Esecuzioni	Tra estrazioni	Intra-estrazioni
				Disposi-ti-vo 1 (sito 1)	Disposi-ti-vo 2 (sito 2)	Disposi-ti-vo 3 (sito 2)	Disposi-ti-vo 4 (sito 3)			
ERBB2	SD	0,20	0,21	0,21	0,18	0,22	0,21	0,20	0,08	0,16
	95% CI	0,15-0,30	0,19-0,23	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	0,05-0,19	0,14-0,19
ESR1	SD	0,18	0,27	0,26	0,27	0,21	0,31	0,30	0,52	0,55
	95% CI	0,13-0,29	0,24-0,30	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	0,39-0,79	0,48-0,64
PGR	SD	0,14	0,15	0,14	0,12	0,19	0,16	0,22	0,07	0,17
	95% CI	0,11-0,22	0,14-0,17	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	0,04-0,26	0,15-0,20
MKI67	SD	0,20	0,18	0,18	0,14	0,15	0,23	0,20	0,05	0,17
	95% CI	0,16-0,30	0,16-0,20	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	Non disp.	0,03-0,68	0,15-0,20

Le varianze specifiche dei parametri degli studi condotti su moduli Versant®kPCR AD (Siemens) sono rappresentati nella Tabella 23. I dati presentati nella Tabella 22 e nella Tabella 23 rivelano collettivamente una notevole differenza nella varianza di tutti i parametri testati tra gli esperimenti condotti su diverse piattaforme qPCR. Il fatto che queste differenze riguardino anche la variabilità, che è legata all'eterogeneità biologica, indica che la fonte della variazione può essere legata al dispositivo.

Tabella 23: Deviazioni standard (SD) dei valori $40-\Delta\Delta Cq$ con intervallo di confidenza (CI) al 95%, secondo varie fonti di variazione analitica (modulo Versant®kPCR AD)

Versant® kPCR AD		Tra siti	Tra esecuzioni					
			Dispositivo 1 (sito 1)		Dispositivo 2 (sito 2)		Dispositivo 3 (sito 3)	
			Tra estrazioni	Tra stra-zioni	Tra estra-zioni	Tra stra-zioni	Tra stra-zioni	Tra estra-zioni
ERBB2	SD	0,48	0,35	0,31	0,15	0,39	0,00**	0,49
	95% CI	0,38-0,67	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.
ESR1	SD	0,66	0,35	0,27	0,00**	0,29	0,18	0,61
	95% CI	0,53-0,90	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.
PGR	SD	0,00*	0,07	0,25	0,10	0,25	0,23	0,33
	95% CI	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.
MKI67	SD	0,40	0,19	0,27	0,10	0,26	0,08	0,38
	95% CI	0,32-0,55	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.	non disp.

Versant® kPCR AD		Tra lotti Mamma-Typer®	Tra lotti RNXtract®	Intra- esecuzioni	Tra estra- zioni	Intra-estra- zioni
ERBB2	SD	0,16	0,22	0,29	0,21	0,41
	95% CI	non disp.	non disp.	non disp.	0,16-0,31	0,38-0,44
ESR1	SD	0,09	0,18	0,26	0,22	0,42
	95% CI	non disp.	non disp.	non disp.	0,16-0,33	0,39-0,46
PGR	SD	0,14	0,11	0,25	0,14	0,28
	95% CI	non disp.	non disp.	non disp.	0,11-0,20	0,26-0,30
MKI67	SD	0,12	0,16	0,27	0,14	0,31
	95% CI	non disp.	non disp.	non disp.	0,10-0,23	0,29-0,34

*La varianza tra siti è completamente spiegata (coperta) dalla varianza tra estrazioni

**La varianza tra estrazioni è completamente spiegata (coperta) dalla varianza intra-estrazioni

Concordanza dei marcatori individuali e delle classificazioni dei sottotipi

Oltre alla deviazione standard per i risultati quantitativi dei marcatori singoli (valori $40-\Delta\Delta Cq$), è stata analizzata la concordanza dei marcatori e la classificazione dei sottotipi all'interno e tra le due piattaforme qPCR (Tabella 24). Il gold standard per valutare la concordanza era basato sul risultato più frequente tra tutte le misurazioni (dopo la dicotomizzazione in positivo e negativo) tra i siti. La concordanza media tra i siti e tra i dispositivi era almeno del 95%.

Tabella 24: Concordanza dello stato dei marcatori e dei sottotipi tra i siti in base al sistema qPCR e tra le diverse piattaforme qPCR

	<i>ERBB2</i>	<i>ESR1</i>	<i>PGR</i>	<i>MKI67</i>
Ciclatore Versant® kPCR	98,1%	94,7%	96,3%	95,1%
LightCycler® 480 II	100,0%	100,0%	98,4%	96,4%
Tra piattaforme	100,0%	96,9%	97,2%	96,9%

Test di interferenza

DNA genomico umano

Al fine di valutare l'effetto della contaminazione da DNA genomico contenuto nell'RNA totale dei preparati nel test MammaTyper®, gli eluati di RNA ottenuti da tre diversi campioni utilizzando il kit RNXtract®, sono stati confrontati in diverse condizioni. Questo includeva campioni a) standard non digeriti con DNasi I, b) digeriti con DNasi I, e c) trattati come per la digestione con DNasi I, ma con l'aggiunta di acqua anziché di DNasi I. I campioni sono stati successivamente analizzati utilizzando RT-qPCR MammaTyper® in una esecuzione che include un controllo positivo e negativo. Tutti i campioni erano validi e hanno dato risultati identici per i marcatori e i sottotipi. Nessun segnale rilevabile è stato osservato per il controllo negativo. I risultati indicano che, a causa della specificità dell'RNA del test MammaTyper®, una fase di digestione della DNasi I del campione di RNA non è essenziale.

Interferenza dovuta al contenuto di cellule tumorali e al carcinoma duttale in situ (DCIS)

Il tessuto tumorale non invasivo patologicamente confermato, tra cui lobuli mammari normali o DCIS (carcinoma duttale in situ) è comunemente parte delle sezioni di tessuto utilizzate per l'estrazione di RNA e può influenzare la quantificazione dell'espressione genica da ¹⁶. Per valutare il rischio di contaminazione tumorale non invasiva che influenza i risultati di MammaTyper® sono stati selezionati campioni con un basso contenuto di cellule tumorali (5-50%) da 10 casi clinici di cancro al seno. Questi sono stati arricchiti fino a un contenuto di cellule tumorali dell'80% per mezzo di macrodissezione.

Le differenze delle misure dei marcatori individuali tra i campioni macrodissezionati e quelli non macrodissezionati sono state determinate per mezzo di RT-qPCR di MammaTyper®. Il disaccordo del livello di espressione dei singoli marcatori è stato studiato per questi campioni accoppiati. I casi sono stati selezionati intenzionalmente per garantire un contenuto variabile di DCIS (10-70%). Un campione è stato escluso a causa di una resa insufficiente di RNA. Come mostrato nella Figura 3, le differenze di $40-\Delta\Delta Cq$ di tutti i campioni e i marcatori erano in media inferiori allo 0,47.

La concordanza della determinazione dei marcatori individuali è stata del 100% per *ERBB2*, *ESR1* e *PGR*. Per *MKI67*, un caso con il 10% di cellule tumorali era negativo nel campione non-macrodissezionato, mentre il campione arricchito era positivo. La macrodissezione di sezioni FFPE per campioni con un contenuto di cellule tumorali del 20% o superiore non è richiesta per l'analisi dell'espressione genica utilizzando il test MammaTyper®.

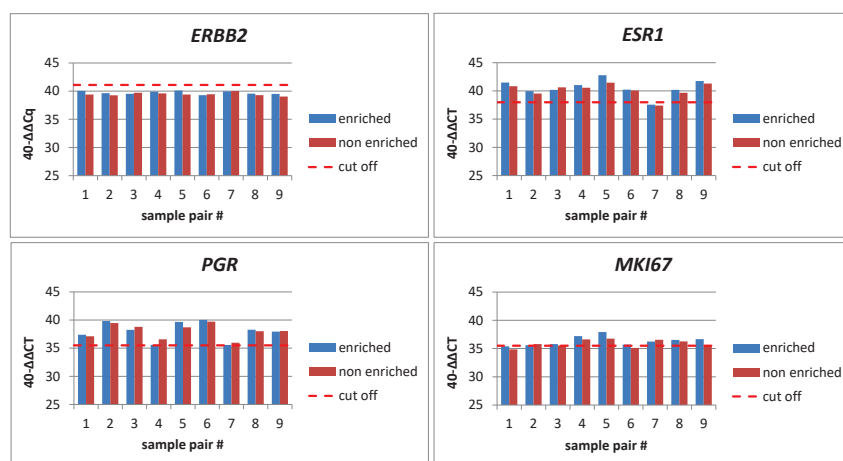


Figura 3: i valori $40-\Delta\Delta Cq$ dei campioni di tumore accoppiati con alto (80%, blu) e basso (5-50%, rosso) contenuto di cellule tumorali e contenuto DCIS (10-70%) variabile adiacente al tumore.

Studio di concordanza del trattamento pre-analitico

Al fine di studiare l'effetto di diversi metodi di isolamento dell'RNA sui risultati di MammaTyper®, sono state prodotte tre sezioni da 10 μm da ciascuno degli otto campioni di tessuto di cancro al seno FFPE e sono state trattate con vari metodi preanalitici. Una di ogni sezione replicata è stata trattata manualmente con il kit RNXtract®, RNeasy® FFPE (Qiagen) e il kit di preparazione del tessuto Versant® (Siemens). L'RNA ottenuto è stato utilizzato in un successivo test MammaTyper®.

La concordanza dei risultati dei singoli marcatori delle tre misurazioni è stata del 100% per *ERBB2* e *ESR1*, dell'88% per *MKI67* e del 75% per *PGR* mentre l'espressione del marcatore nei campioni con risultati discordanti era prossima al cut-off (Figura 4).

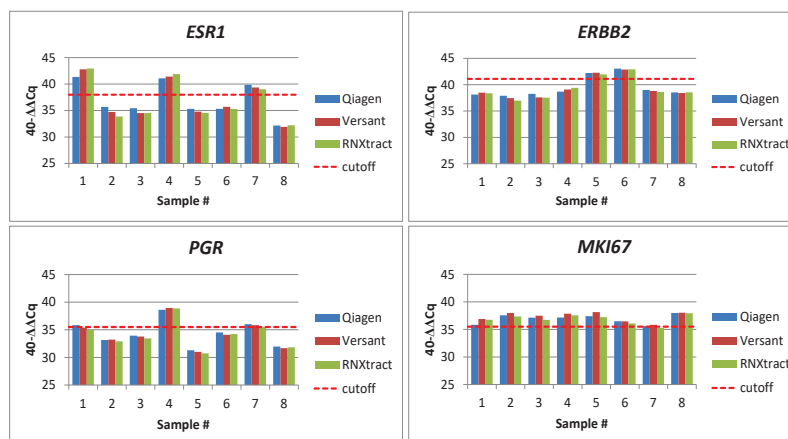


Figura 4: I valori $40-\Delta\Delta Cq$ di tre campioni FFPE di tumore trattati con il Kit di estrazione dell'RNA RNXtract® e altri due kit di estrazione di RNA disponibili in commercio (adatti all'estrazione di RNA da materiale FFPE).

Sensibilità

La performance analitica del kit MammaTyper® è stata convalidata per basse concentrazioni iniziali di RNA. A questo scopo sono stati analizzati campioni diluiti in serie da tessuto di cancro al seno FFPE di vari sottotipi ed eluati di RNA da 6 biopsie tumorali di routine. Per l'intera serie di diluizioni, i risultati dei campioni erano in accordo con quelli dei campioni non diluiti fino al limite di validità. La validità del campione è stata determinata mediante valori Cq predefiniti per l'espressione di *B2M* e *CALM2*.

Come mostrato nella Figura 5, l'espressione dei singoli marcatori è rimasta stabile fino a una diluizione di 1:1000. Tutti e sei i campioni bioptici hanno dato risultati validi secondo le specifiche del test, consentendo un'efficace sottotipizzazione dei tumori sulla base di questo materiale campione.

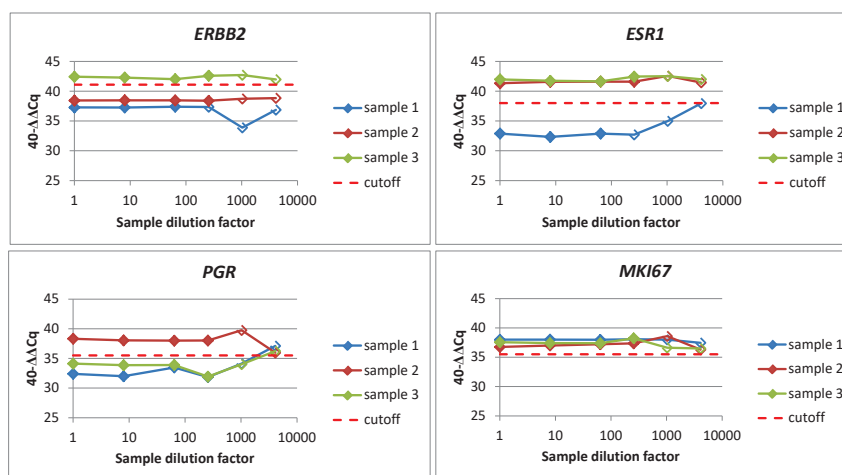


Figura 5: I valori $40-\Delta\Delta Cq$ di una serie di diluizione di tre eluati di RNA derivati da diversi campioni di tumore (rombi pieni: risultati validi; rombi vuoti: risultati non validi).

Limite del bianco (LoB), limite di rilevazione (LoD), limite di quantificazione (LoQ), linearità ed efficienza della PCR

Il limite del bianco (LoB), ossia la misura massima che è probabile osservare per un campione bianco con una probabilità specifica, è stato determinato separatamente per ogni mix di saggi e per ogni piattaforma qPCR con 20 repliche di controlli negativi utilizzando acqua invece di un campione di RNA (120 reazioni in totale). Assumendo una distribuzione normale (gaussiana) dei valori Cq, il LoB è stato fissato a un valore medio Cq di 40. Questo valore è stato osservato in almeno il 95% delle misurazioni per ogni mix di test.

Il limite di rilevazione (LoD) è stato definito come la più piccola concentrazione di analita (RNA) che permette una differenziazione coerente dal LoB. Qui, il LoD è stato assunto come la quantità di RNA totale del campione (positivo per tutti i geni target) per il quale il valore Cq è inferiore al LoB con una probabilità del 95%.

Il limite di quantificazione (LoQ) è stato definito come la quantità di RNA del gene target per ogni marcatore che produce un valore Cq che: (a) è inferiore o uguale al valore Cq del LoD, e (b) mostra una distanza dalla curva di regressione della serie di diluizioni inferiore a 0,7 Cq per ogni diluizione del campione clinico o dell'RNA IVT. Il valore della distanza riflette i valori di variazione delle repliche della PCR riportati in precedenza, che sono compresi tra 0,5 e 1,0 Cq¹⁷.

Il campo di misura analitico (AMR) per il test MammaTyper® sul LightCycler® 480 instrument II è limitato per numeri di molecole molto alti dalla linea di base fissa. Il limite inferiore dell'AMR è limitato dal LoD. Un campione principale preparato unendo gli eluati di ciascuna delle tre sezioni di un campione di paziente FFPE (3 sezioni per estrazione), è stato misurato mediante spettrofotometria (NanoDrop® Thermo Fisher Scientific) per determinare il contenuto dell'analita (96,7 ng/μl) e diluito in serie in RNA vettore (10 ng/μl). Le curve di diluizione sono state analizzate con tutte e tre i mix di saggi su entrambi i sistemi qPCR. La stessa procedura è stata effettuata per l'RNA IVT di MammaTyper®. I numeri di molecole corrispondenti alla più alta concentrazione dell'RNA IVT sono stati calcolati online con un calcolatore di peso molecolare basato sul web (www.currentprotocols.com).

Il numero di molecole nel campione master è stato estrapolato dalla rispettiva funzione lineare delle curve di regressione della serie di diluizione dell'RNA IVT per ogni marcatore e gene di riferimento. Le concentrazioni corrispondenti a valori di Cq al di fuori dell'intervallo di misurazione analitica (come definito dalle impostazioni dello strumento descritte nelle istruzioni per l'uso) sono state escluse dall'analisi.

Risultati

Tutte le misurazioni in bianco non hanno mostrato alcun segnale di amplificazione fino a 40 cicli. Il LoQ era ugualmente basso come il LoD per tutti i geni target e di riferimento per la serie di diluizioni di RNA IVT. I dati per l'efficienza, la linearità e l'intervallo di misurazione analitica sono riassunti nella Tabella 25 a e b per gli esperimenti eseguiti sui due diversi sistemi qPCR per il campione master FFPE e l'RNA IVT (controllo positivo).

La gamma di misurazione analitica sugli strumenti Versant® e LightCycler® si estendeva a 7 e 6 livelli di \log_{10} di una serie di diluizioni di RNA IVT, rispettivamente. Le efficienze di amplificazione variavano dal 99% al 117% per tutte le qPCR dei geni target utilizzando entrambi gli strumenti.

Tabella 25: LoD, AMR, efficienza qPCR e linearità per tutti i geni target per un campione master FFPE o RNA IVT su due strumenti di PCR in tempo reale, Versant®kPCR (a) e Roche LightCycler® 480 II (b)

a		ERBB2	ESR1	PGR	MKI67	B2M	CALM2
Campione master FFPE	LoD [Cq]	34,36	35,54	32,33	35,66	35,80	34,78
	LoD [molecole]	10	5	87	7	7	8
	AMR [Cq]	21,05-34,36	19,13-35,54	21,13-32,33	23,97-35,66	16,78-35,80	23,90-34,78
	Efficienza [%]	106	105	106	101	100	111
	Linearità	0,999	0,999	0,995	0,999	0,999	0,998
IVT-RNA	LoD [Cq]	35,31	35,60	36,72	36,41	36,22	33,69
	LoD [molecole]	5	5	5	5	5	18
	AMR [Cq]	12,36-35,31	12,45-35,60	12,64-36,72	11,63-36,41	12,41-36,22	11,67-33,69
	Efficienza [%]	105	104	100	99	100	100
	Linearità	0,999	0,999	1,000	0,999	1,000	1,000
b		ERBB2	ESR1	PGR	MKI67	B2M	CALM2
FFPE Master Sample	LoD [Cq]	33.56	36.47	33.56	35.47	35.6	35.62
	LoD [molecole]	40	8	64	12	12	9
	AMR [Cq]	22.32-33.56	21.69-36.47	21.20-33.56	24.61-35.47	17.60-35.60	25.26-35.62
	Efficiency [%]	109	113	115	111	109	117
	Linearity	1.000	1.000	0.996	0.999	0.999	0.997
IVT-RNA	LoD [Cq]	34.64	35.21	35.44	34.91	34.97	36.51
	LoD [molecules]	18	18	18	18	18	5
	AMR [Cq]	17.34-34.64	18.52-35.21	17.56-35.44	19.27-34.91	17.9-34.97	18.87-36.51
	Efficiency [%]	106	109	101	103	107	103
	Linearity	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000

11.2 Performance cliniche

RT-qPCR ha una serie di vantaggi metodologici ampiamente riconosciuti rispetto all'IHC, che sembrano particolarmente vantaggiosi nel contesto della riduzione dei bias della valutazione di routine del Ki-67; RT-qPCR è quantitativa per natura con un range dinamico molto più ampio, non richiede un occhio esperto e i risultati non sono influenzati da interpretazioni soggettive¹⁸.

Due studi di valutazione delle prestazioni cliniche, studio FinHer MammaTyper[®] (vedere 12.2.1) e 1° studio neoadiuvante MammaTyper[®] (vedere 12.2.2), sono stati eseguiti per indagare la performance clinica di MammaTyper[®] per quanto riguarda l'accordo con IHC e la validità prognostica e predittiva.

11.2.1 Studio FinHer MammaTyper[®]

Studio FinHer MammaTyper[®] (ClinicalTrials.gov: NCT02244580) era un'analisi retrospettiva di campioni raccolti prospetticamente durante il FinHer-trial (Studio internazionale controllato: ISRCTN76560285). Lo studio intendeva determinare la validità prognostica e predittiva dei risultati di MammaTyper[®] per le pazienti con carcinoma mammario con linfonodi negativi e positivi che ricevono una chemioterapia sistemica adiuvante, nonché di confrontare MammaTyper[®] con i risultati IHC.

Descrizione e disegno dello studio FinHer

Il FinHer-trial era uno studio clinico prospettico randomizzato multicentrico che è stato condotto in 17 siti di sperimentazione in Finlandia sotto la direzione medica del Prof. Dr. Heikki Joensuu^{19,20}.

Gli obiettivi dello studio FinHer erano:

1. Confrontare l'integrazione di docetaxel monoagente con vinorelbina monoagente come chemioterapia adiuvante del cancro al seno in una popolazione di pazienti con diagnosi di cancro al seno che hanno un rischio stimato di recidiva del cancro al seno del 25% o superiore entro i primi cinque anni calcolato dalla data di diagnosi del cancro al seno (o un rischio stimato superiore al 35% entro i primi 10 anni).
2. Studiare l'efficacia e la sicurezza di un breve ciclo di Herceptin adiuvante (somministrato per 9 settimane) in una popolazione di pazienti con diagnosi di cancro al seno HER2-positivo che hanno un alto rischio (oltre il 40%) di recidiva del cancro al seno.

1.010 donne con diagnosi di cancro al seno con linfonodo ascellare positivo o con linfonodo negativo ad alto rischio sono state randomizzate a ricevere docetaxel/FEC o vinorelbina/FEC con o senza trastuzumab. Prima della randomizzazione, è stata eseguita la caratterizzazione istopatologica dei campioni di tumore dalle resezioni. L'espressione ER, PR, HER2 e Ki-67 è stata determinata mediante immunistochimica secondo le linee guida dell'istituto. I tumori potevano essere HER2-positivi o HER2-negativi. Lo stato di HER2 è stato determinato dal materiale di resezione del tessuto tumorale con l'anticorpo monoclonale CB11 per la colorazione immunistochimica. Nei casi in cui lo stato di HER2 è stato segnato 2+ o 3+ da IHC, è stato eseguito un test CISH in uno dei due laboratori centrali. Il Ki-67 è stato determinato dall'anticorpo MIB-1 e un valore di cutoff di $\geq 20\%$ di nuclei positivi, come definito nelle 13^{esime} linee guida di St Gallen³, è stato utilizzato per la categorizzazione del marcatore.

Il percorso di trattamento clinico del FinHer-trial non corrisponde alle attuali raccomandazioni terapeutiche in tutti gli aspetti. Vale a dire che il trattamento con vinorelbina come è stato usato nello studio FinHer non è lo standard clinico dal punto di vista odierno.

Questo è stato accettato per la valutazione delle prestazioni cliniche del MammaTyper[®] perché era uno studio retrospettivo, in cui i risultati clinici dello studio sono stati utilizzati solo per convalidare i risultati diagnostici.

Descrizione dello studio MammaTyper[®]-FinHer

Lo studio mirava alla valutazione delle prestazioni cliniche del Kit MammaTyper[®] utilizzando campioni di pazienti della sperimentazione FinHer. La coorte utilizzata per la convalida delle prestazioni cliniche di MammaTyper[®] rappresenta solo la frazione (79%) della coorte FinHer totale, per la quale è stato possibile raccogliere campioni di tessuto. Il FinHer-trial è stato approvato dal comitato etico competente. I tumori di tutti i pazienti, per i quali un blocco FFPE era disponibile e un modulo di consenso del paziente era stato compilato, sono stati analizzati nell'ambito di questo studio. 801 blocchi FFPE potrebbero essere raccolti retrospettivamente dai pazienti della coorte dello studio FinHer.

Obiettivi della valutazione delle prestazioni cliniche in sintesi

- Dimostrazione del valore prognostico dei risultati del sottotipo MammaTyper[®] per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia a distanza e la sopravvivenza globale.
- Confronto dei risultati della RT-qPCR con i risultati del metodo IHC.
- Dimostrazione del valore predittivo dei risultati del sottotipo Mamma-

Typer® per quanto riguarda un beneficio del taxano come integrazione alla chemioterapia nel gruppo di pazienti di *tipo Luminal B (HER2 negativo)*.

- Dimostrazione di una migliore determinazione di *MKI67* usando RT-qPCR rispetto alla determinazione di Ki-67 con IHC. Confronto dei casi discordanti con riferimento al relativo esito clinico.

Analisi

L'endpoint clinico primario era la sopravvivenza libera da malattia a distanza di 5 anni (DDFS) del *tipo Luminal A* rispetto a tutti gli altri pazienti. La sopravvivenza libera da progressione è definita come l'intervallo tra la diagnosi e la comparsa di metastasi a distanza. Gli endpoint clinici secondari includevano la sopravvivenza globale (OS) a 5 anni, definita come l'intervallo tra la diagnosi e la morte. Gli hazard ratio (HR) o rapporti di rischio per l'influenza del sottotipo sulla sopravvivenza sono serviti come endpoint. L'analisi di sopravvivenza è stata fatta per tutti i pazienti indipendentemente dallo stato linfonodale e per un sottogruppo con 0 - 3 linfonodi positivi.

L'endpoint primario non clinico era la correlazione di *MKI67* determinato da MammaTyper® con il Ki-67 mediante IHC utilizzando le statistiche kappa. Gli endpoint secondari includevano inoltre il confronto tra *ESR1*, *PGR* e *ERBB2* con dati IHC e/o CISH. Sono stati determinati l'accordo positivo e negativo e la percentuale complessiva di accordo (PPA, NPA, OPA). I valori kappa sono stati messi in relazione secondo le regole specificate in letteratura²¹. I risultati di questo studio sono stati valutati in funzione di diverse domande (sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia a distanza) per identificare una rilevanza prognostica e predittiva dei risultati di MammaTyper®. Inoltre i casi discrepanti dei risultati di *MKI67*/Ki-67 sono stati analizzati per identificare i potenziali vantaggi della misura quantitativa di MammaTyper® rispetto all'IHC semi-quantitativo.

Oltre agli endpoint definiti nel piano di analisi statistica, ulteriori valutazioni dei risultati sono state effettuate successivamente.

Risultati

Delle 801 fette FFPE disponibili per l'estrazione dell'RNA con RNXtract® e la misurazione con il MammaTyper®, 36 (4,5%) non hanno soddisfatto i criteri di validità dei campioni predefiniti per il test MammaTyper® lasciando 765 (95,5%) per l'analisi statistica finale. Dei 765 pazienti disponibili per l'analisi, 120 (15,7%) avevano metastasi a distanza e 62 (8,1%) sono morti.

Tabella 26: Frequenze dei sottotipi determinati con MammaTyper® nello studio FinHer

Sottotipo	ERBB2	ESR1	PGR	MKI67	Quantità	[%]	Quantità sotto-tipo	Sotto-tipo [%]
Non definito/ mancante	neg	neg	pos	neg	2	0,26	27	3,53%
				pos	17	2,22		
	pos	neg	pos	pos	8	1,05		
<i>Tipo Luminal A</i>	neg	pos	pos	neg	174	22,75	174	22,75%
<i>HER2 positivo (non-luminale)</i>	pos	neg	neg	neg	3	0,39	67	8,76%
				pos	64	8,37		
<i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i>	pos	pos	pos	neg	7	0,92	89	11,63%
				pos	55	7,19		
			neg	neg	5	0,65		
				pos	22	2,88		
<i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i>	neg	pos	pos	pos	252	32,94	315	41,18%
				neg	17	2,22		
			pos	46	6,01			
<i>Triplo negativo (duttale)</i>	neg	neg	neg	neg	6	0,78	93	12,16%
				pos	87	11,37		
Totale					765	100	765	100%

Ulteriori combinazioni di risultati di marcatori non definiti nella definizione di St Gallen dei sottotipi³, che sono stati trovati anche in un censimento epidemiologico all'interno del programma *Sorveglianza, epidemiologia e risultati finali* (SEER), potrebbero essere identificate nella coorte FinHer sulla base della misura di MammaTyper® (n=27, pari al 3,5%). In questa monografia, che è stata compilata dal National Cancer Institute (NCI), la sopravvivenza delle pazienti con cancro al seno con un cancro diagnosticato dal 1990-2001 è stata studiata in base alle caratteristiche del tumore. Il 2,4% di pazienti ER negativi/PR positivi è stato registrato nel gruppo totale di pazienti con cancro al seno (n=230.922)¹².

Beneficio prognostico riferito alla sopravvivenza libera da malattia a distanza e al tasso di sopravvivenza globale per sottotipo

I risultati dell'analisi statistica rivelano che la sottotipizzazione utilizzando il kit MammaTyper® ha dato luogo a un più alto tasso di DDFS a 5 anni, se si confronta il *tipo Luminal A* con i restanti pazienti (p=0,0018; HR 0,423; 95%-CI=0,246-0,726). La differenza è apparsa anche analizzando i pazienti che

avevano fino a tre linfonodi positivi ($p=0,0062$; HR 0,241; 95%CI=0,087-0,668). Anche il tasso di sopravvivenza globale a 5 anni è stato significativamente diverso quando si è confrontato il *tipo Luminal A* con gli altri sottotipi in tutti i pazienti ($p=0,0063$; HR 0,311; 95%-CI=0,134-0,719) o nei pazienti con un massimo di tre linfonodi positivi ($p=0,0289$; HR 0,108; 95%-CI=0,015-0,795)¹³.

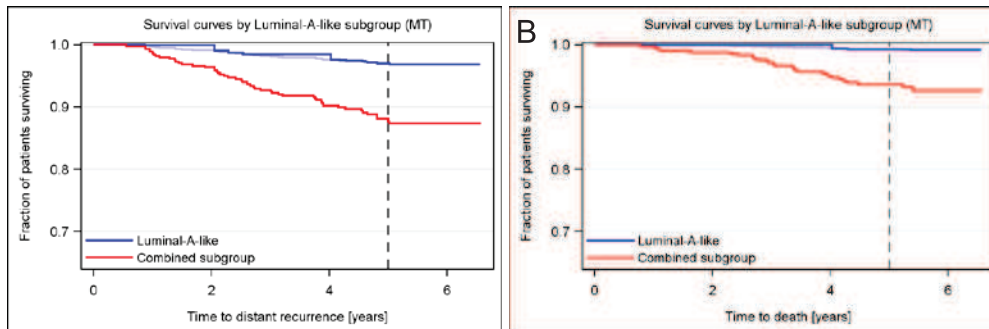


Figura 6: A) Analisi Kaplan Meier della DDFS dei pazienti con un massimo di tre linfonodi positivi ($n=536$). Sopravvivenza libera da malattia a 5 anni a distanza del 97% per i pazienti di *tipo Luminal A* contro l'88% degli altri sottotipi. **B)** Analisi Kaplan Meier della sopravvivenza globale dei pazienti con un massimo di tre linfonodi positivi ($n=536$). Sopravvivenza globale a 5 anni del 99% dei pazienti di *tipo Luminal A* rispetto al 94% degli altri sottotipi.

Previsione del beneficio del taxano

Il valore predittivo della sottotipizzazione molecolare utilizzando il test MammaTyper® è stato valutato secondo il piano di analisi statistica confrontando la sopravvivenza libera da malattia a distanza e la sopravvivenza globale dei pazienti *tipo Luminal B (HER2 negativo)* trattati con docetaxel/FEC rispetto a vinorelbina/FEC in un'ulteriore analisi. Un beneficio significativo dell'aggiunta di docetaxel sulla base di questi dati di misurazione, si osserva solo per il sottotipo *tipo Luminal B (HER2 negativo)*, come già pubblicato in precedenza per altri studi²². Al contrario, né i pazienti *tipo Luminal A* né *HER2 positivo* né *Triplo negativo* hanno mostrato differenze significative per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia a distanza o la sopravvivenza globale. Quando la sottotipizzazione è stata fatta con metodi IHC e secondo le linee guida di St. Gallen, non è stato osservato alcun beneficio significativo di sopravvivenza libera da malattia a distanza o di sopravvivenza globale dopo il trattamento con docetaxel per il *tipo Luminal B (HER2 negativo)* o per gli altri sottotipi nello studio FinHer¹³.

Tabella 27: Previsione di un beneficio del docetaxel in merito alla sopravvivenza globale (OS) e alla sopravvivenza libera da malattia a distanza (DDFS) dopo 5 anni per sottotipi determinati utilizzando il metodo MammaTyper® nel set completo di analisi dello studio MammaTyper®FinHer.

5 anni di OS	Doc/FEC	Vin/FEC	HR	valore p	95%-CI (HR)
<i>Tipo Luminal A</i>	96%	98%	2,10	0,393	0,38-11,51
<i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i>	97%	89%	0,31	0,012	0,12-0,77
<i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i>	91%	92%	0,93	0,914	0,23-3,70
<i>HER2 positivo</i>	85%	89%	1,31	0,665	0,38-4,49
<i>Triplo negativo</i>	86%	82%	0,80	0,673	0,29-2,25
5 anni di DDFS	Doc/FEC	Vin/FEC	HR	valore p	95%-CI (HR)
<i>Tipo Luminal A</i>	93%	92%	0,87	0,790	0,32-2,40
<i>Tipo Luminal B (HER2 negativo)</i>	88%	78%	0,51	0,020	0,29-0,90
<i>Tipo Luminal B (HER2 positivo)</i>	85%	78%	0,65	0,374	0,25-1,70
<i>HER2 positivo</i>	78%	84%	1,42	0,527	0,48-4,25
<i>Triplo negativo</i>	76%	77%	1,01	0,977	0,44-2,34

11.2.2 Descrizione del 1° studio neoadiuvante MammaTyper®

La stratificazione accurata dei pazienti per il trattamento neoadiuvante richiede l'uso di biomarcatori che sono in grado di identificare in modo affidabile i tumori che sono molecolarmente adatti a rispondere ai regimi citotossici, come quelli che mostrano un'elevata attività proliferativa delle cellule tumorali. Tuttavia, il metodo ampiamente favorito per valutare la proliferazione tumorale nei laboratori di patologia locali, vale a dire la rilevazione dell'antigene nucleare Ki-67 mediante immunohistochimica (IHC), è soggetta a una notevole variabilità tra osservatori^{7,8}.

Al contrario, l'espressione genica *MKI67* analizzata da MammaTyper® in campioni di routine clinica derivati da pazienti che hanno partecipato allo studio clinico S080, ha dimostrato di migliorare chiaramente l'accuratezza diagnostica per la previsione di pCR²³.

Le agobiopsie preoperatorie FFPE accompagnate da dati clinicopatologici, compresi i dati di punteggio continuo per Ki-67 mediante stima visiva IHC, erano disponibili per 59 pazienti.

Per l'isolamento dell'RNA, una singola sezione di 10 µm dal blocco di paraffina è stata trattata in base al kit RNXtract® disponibile in commercio.

Gli esperimenti sono stati eseguiti su uno strumento LightCycler® 480 II secondo le istruzioni per l'uso di MammaTyper®. La performance predittiva di MammaTyper® e IHC, è stata stimata tramite l'analisi ROC (receiver operator characteristics) (Figura 7 e Tabella 28).

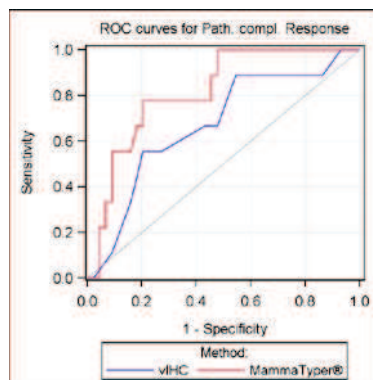


Figura 7: Analisi ROC per la risposta patologica completa utilizzando le misurazioni Ki-67 vIHC (blu) e i valori *MKI67* continui misurati con MammaTyper® (rosso). Le curve ROC mostrano una migliore identificazione dei rispondenti rispetto ai non rispondenti attraverso la determinazione dell'mRNA.

Tabella 28: Analisi ROC per la risposta completa patologica (SE: errore standard, AUC: area sotto la curva, CI: intervallo di confidenza)

Metodo	Stima AUC	SE	95%CI (AUC)	valore p
Ki-67 (vIHC)	0,67	0,10	0,48-0,87	0,086
<i>MKI67</i> (40- $\Delta\Delta$ Cq)	0,82	0,07	0,68-0,95	<0,001

I cut-off sono stati scelti intenzionalmente in modo da garantire il 100% di sensibilità e la più alta specificità disponibile secondo le coordinate ROC. Questi cut-off (37,23 per MammaTyper® e 3,5% per IHC) sono stati successivamente utilizzati per classificare i tumori a bassa e ad alta proliferazione. Questo approccio ha prodotto le misure di accuratezza diagnostica presentate nella Tabella 29. Un vero risultato positivo significa un tumore con proliferazione aumentata, che reagisce a una terapia neoadiuvante con una scomparsa completa di tutte le cellule tumorali (pCR) e viceversa¹⁴.

Tabella 29: Accuratezza diagnostica; PPV valore predittivo positivo; NPV valore predittivo negativo; LR+ rapporto di verosimiglianza positivo; LR- rapporto di verosimiglianza negativo

Accuratezza diagnostica [%]	MammaTyper®	IHC
Sensibilità	100	100
Specificità	52	7
PPV	30	18
NPV	100	100
LR+	2,1	1
LR-	0	0

Quando tutti i tumori con risposta patologica completa sono stati riconosciuti con i cut-off scelti per la massima sensibilità per entrambi i metodi (nessun falso negativo), la specificità era del 52% per la determinazione di *MKI67* con MammaTyper® mentre la specificità dell'immunoistochimica di Ki-67 era solo del 7%. Ciò significa che, di quei tumori che non rispondono alla chemioterapia neoadiuvante, il 93% ha mostrato un'alta espressione di Ki-67 determinata da IHC (falsi positivi), rispetto al 48% dell'uso di MammaTyper®.

Applicando questi risultati, la classificazione MammaTyper®*MKI67* per predire la pCR potrebbe ovviamente migliorare l'accuratezza diagnostica rispetto all'IHC Ki-67 e aumentare di 7 volte il numero di pazienti che potrebbero tranquillamente rinunciare alla chemioterapia neoadiuvante inefficace¹⁴.

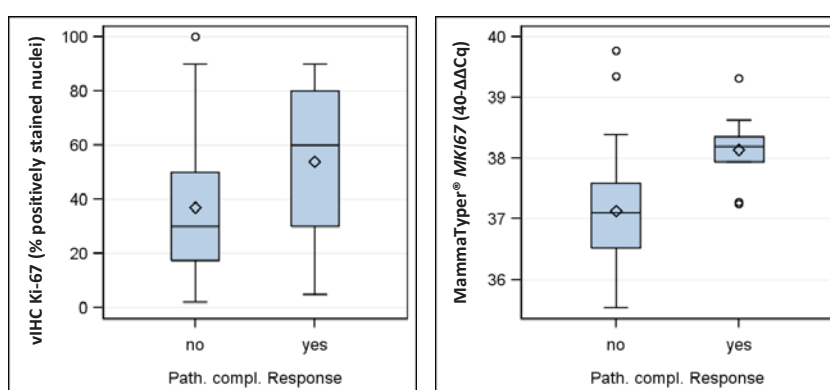


Figura 8: I diagrammi a scatola e baffi che mostrano la distribuzione dei risultati vIHC (sinistra) e i risultati RT-qPCR mRNA continui (destra). Le differenze sono state studiate utilizzando il test di Mann-Whitney.

La performance predittiva di MammaTyper® è stata infine significativamente dimostrata dalla regressione logistica (Tabella 30) rispetto al vIHC (MammaTyper® Wald p=0,01; IHC p= 0,1).

Tabella 30: Risultati della regressione logistica per la previsione di pCR per la determinazione visiva dell'IHC Ki-67 (vIHC) e MammaTyper®*MKI67*.

Metodo	Stima parametri	SE	Rapporto di probabilità	95%CI (OR)	Wald Chi-quadro	valore p
vIHC	0,02	0,01	1,02	1,00-1,05	2,64	0,104
MammaTyper®	1,23	0,50	3,44	1,29-9,15	6,10	0,014

12. Conclusione

La valutazione delle prestazioni cliniche del kit MammaTyper® utilizzando campioni di pazienti della coorte dello studio FinHer ha confermato la capacità del test MammaTyper® di discriminare accuratamente tra i sottotipi molecolari *tipo Luminal A*, *tipo Luminal B (HER2 negativo)*, *tipo Luminal B (HER2 positivo)*, *HER2 positivo (non-luminale)* e *Triplo negativo (duttale)*.

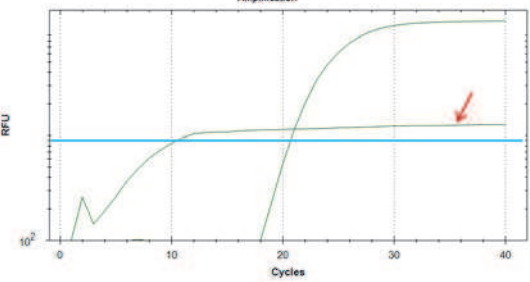
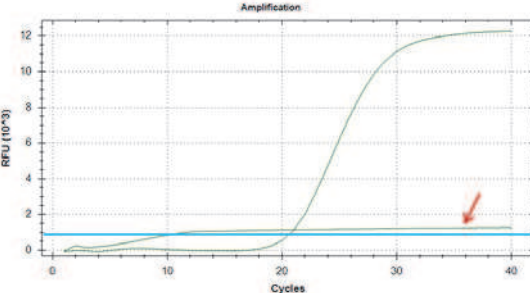
Il livello di espressione mRNA dei marcatori *ERBB2*, *ESR1* e *PGR* determinato da MammaTyper® mostra una buona concordanza con l'espressione proteica determinata da IHC. L'accordo dell'espressione di MKI67 con i risultati di Ki-67 IHC è stato moderato. Tuttavia, nei casi di discrepanza MKI67/Ki-67 positivi per ESR1, i risultati di MammaTyper® erano in accordo con l'esito clinico, con un esito migliore per i pazienti con bassa espressione di MKI67 e un esito peggiore per i pazienti con alta espressione di MKI67. Questi risultati hanno indicato la superiorità della sottotipizzazione basata su MammaTyper® RT-qPCR rispetto all'IHC.

I risultati indicano che i risultati del test MammaTyper® hanno un valore prognostico diretto per la sopravvivenza globale e il rischio di sviluppare metastasi nei pazienti. La classificazione dei pazienti in sottotipi *tipo Luminal B (HER2 negativo)* basata sulla determinazione precisa dei valori di *MKI67* ha permesso di predire la risposta di un paziente a una terapia chemioendocrina integrata con taxani nello studio MammaTyper® FinHer. In futuro una terapia con gravi effetti collaterali potrebbe essere risparmiata alle pazienti con cancro al seno con un sottotipo *tipo Luminal A*, *tipo Luminal B (HER2 positivo)*, *HER2 positivo* e *Triplo negativo*, che non beneficerebbero o ne beneficerebbero in modo insignificante dell'integrazione con taxani.

Nell'ambito del 1° studio adiuvante di MammaTyper® con campioni di routine clinica di pazienti che hanno partecipato allo studio S080, è stato dimostrato che la previsione di un beneficio della chemioterapia neoadiuvante potrebbe essere supportato dalla determinazione quantitativa dell'espressione dell'mRNA di *MKI67*.

13. Risoluzione dei problemi e correzione degli errori


Problema	Possibile causa	Azione raccomandata
Messaggio di avvertimento o di errore sullo strumento	Impostazioni errate dello strumento. Collegamenti errati.	Controllare le informazioni e i codici di errore del produttore del dispositivo. Se necessario, riavviare lo strumento. Consultare l'assistenza tecnica del produttore del dispositivo.
LightCycler® 480 II o cobas z® 480: Messaggio di errore "Alcuni campioni superano il valore della banda di rumore nella regione di calcolo del background"	Fluorescenza fluttuante delle curve di amplificazione di un singolo campione o di alcuni campioni che attraversano la banda del rumore nella regione di background per motivi sconosciuti.	Escludere le misurazioni dall'analisi creando un sottoinsieme senza queste posizioni della piastra e ripetere l'analisi. Se più di una misurazione di una triplicata di un campione è affetta, ripetere il test MammaTyper® per questo campione.
Nessun segnale o amplificazione	Si è verificato un errore durante la preparazione del PCR. Condizioni di PCR sbagliate. Impostazioni errate dello strumento.	Procedere rigorosamente secondo le istruzioni per l'uso. Controllare il materiale campione. Controllare le impostazioni dello strumento.
<u>Controllo negativo:</u> Amplificazione rilevata, che causa un Cq mediano < 40 (uno o più parametri). Esecuzione non valida (!)	Scambio di reagenti. Contaminazione con RNA o prodotto PCR.	Pulire tutte le superfici. Trattamento UV del banco di lavoro. Rigorosa separazione spaziale del pre-PCR dal post-PCR. Scartare i reagenti interessati. Ripetere l'esecuzione.
<u>Controllo positivo:</u> Valore Cq mediano di uno o più parametri [ERBB2, ESR1, PGR, MKI67, B2M, CALM2] fuori dal range di accettazione Esecuzione non valida (!)	Si è verificato un errore durante la preparazione della PCR (ad esempio, è stata usata una quantità errata di controllo positivo). Condizioni di PCR sbagliate. Componenti del test non funzionali. Errore nell'analisi dei dati, ad esempio le impostazioni della soglia.	Controllare la preparazione della PCR, le impostazioni dello strumento e l'analisi dei dati. Procedere rigorosamente secondo le istruzioni per l'uso fornite. Tenere conto delle avvertenze e delle precauzioni nel capitolo 6. Ripetere l'esecuzione.
<u>Campione:</u> Cq mediano [$B2M_{\text{campione}}$] – [$\text{CombRef}_{\text{PC}}$] E/O Cq mediano [$CALM2_{\text{campione}}$] – [$\text{CombRef}_{\text{PC}}$] non soddisfano i criteri di accettazione Campione non valido (!)	Uso di materiale di partenza insufficiente o sbagliato. Scarsa qualità del campione FFPE. Estrazione dell'RNA non corretta.	Il campione non deve essere analizzato. Se si è verificato un errore durante la preparazione della PCR, ripetere la misurazione. Nuova estrazione di RNA con più materiale di partenza Eeguire l'estrazione dell'RNA esattamente secondo le istruzioni del produttore. Controllare il materiale di partenza (RNA).

Problema	Possibile causa	Azione raccomandata
<p>Curve anomale che superano la soglia in assenza di una reale amplificazione, causando segnali falsi positivi (valori Cq).</p> <p>Identificazione delle curve anomali:</p> <p>(1) Vista log: corrono quasi parallelamente alla soglia (indicata dalla freccia rossa, rispetto a una curva di amplificazione normale)</p>  <p>(2) Vista lineare: non mostrano alcuna fase esponenziale (indicata dalla freccia rossa, rispetto a una curva di amplificazione normale)</p> 	<p>A causa di una deriva fluorescente anomala nei primi cicli di un'esecuzione, il software dello strumento sceglie impostazioni automatiche errate della linea di base.</p> <p>Questo può avvenire solo in assenza di molecole target, ad esempio nei controlli negativi.</p>	<p>Una volta identificata una curva anomala, impostare il risultato su Cq = 40 per questa misurazione.</p> <p>Nota: Le curve di amplificazione reali nei controlli negativi indicano una contaminazione e non sono impostate su Cq = 40.</p>

14. Letteratura

1. Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736-1747 (2011).
2. Smid, M. *et al.* Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res* 68, 3108-3114 (2008).
3. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 24, 2206–2223 (2013).
4. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752 (2000).
5. Allred, D. C. Commento: Hormone Receptor Testing in Breast Cancer: A Distress Signal from Canada. *The Oncologist* 13, 1134–1136 (2008).
6. Perez, E. A. *et al.* Cardiac Safety Analysis of Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel With or Without Trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Breast Cancer Trial. *JCO* 26, 1231-1238 (2008).
7. Polley, M.-Y. C. *et al.* An international Ki67 reproducibility study. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1897–1906 (2013).
8. Varga, Z. *et al.* How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS ONE* 7, e37379 (2012).
9. Vörös, A., Csörgő, E., Nyári, T. & Cserni, G. An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology* 80, 111-118 (2013).
10. Nielsen TO. *et al.* Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group_ JNCI J Natl Cancer Inst (2021) 00(0): djaa201
11. Rimm DL. *et al.* An international multicenter study to evaluate reproducibility of automated scoring for assessment of Ki67 in breast cancer_ Modern Pathology (2019) 32:59–69
12. Ries LAG. *et al.* SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD, (2007)
13. Wirtz RM. *et al.* Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast Cancer Res Treat.* 57(3):437-46 (2016)
14. Sinn, HP., Schneeweiss, A., Keller, M. *et al.* Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer* 17, 124 (2017).
15. Schneeweiss *et al.* A randomized phase II trial of doxorubicin plus pemetrexed followed by docetaxel versus doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel as neoadjuvant treatment of early breast cancer *Ann. Oncol.* 22, 609-617 (2011)
16. Vermeulen, J. *et al.* External oligonucleotide standards enable cross laboratory comparison and exchange of real-time quantitative PCR data. *Nucl. Acids Res.* 37, e138-e138 (2009).
17. Kotoula, V. *et al.* Sample parameters affecting the clinical relevance of RNA biomarkers in translational breast cancer research. *Virchows Arch.* 462, 141–154 (2013).
18. Noske, A. *et al.* Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765) *Breast Cancer Res Treat* (2011)
19. Joensuu, H. *et al.* Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J. Clin. Oncol.* 27, 5685–5692 (2009).
20. Joensuu, H. *et al.* Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without Trastuzumab for Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 354, 809-820 (2006).
21. Altman, D. G. & Bland, J. M. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 32, 307-317 (1983).
22. Nitz, U. *et al.* Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann. Oncol.* 25, 1551–1557 (2014).
23. Sinn *et al.* Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy. *GeburtshilfeFrauenheilkd.* 54 (10), 552-8 (1994)

15. Spiegazione dei simboli

	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Produttore
	Temperatura di conservazione
	Contiene abbastanza materiale per x test
	Stare lontano dalla luce del sole



Cerca Biotech GmbH
Wiesenhüttenstraße 11,
60329, Francoforte sul Meno
Germania
Tel: +44-800-699-0772
E-mail: info@cercabiotech.com
Web: <http://www.cercabiotech.com>

16. Stato di revisione

Le istruzioni per l'uso correnti sono disponibili in versione 1.0 e sono state rilasciate a (Novembre 2021).

17. Avviso legale

I marchi Cerca Biotech GmbH non possono essere utilizzati senza previo consenso scritto.

Il kit MammaTyper® si basa su una tecnologia brevettata, che è di proprietà di Cerca Biotech GmbH, ed è protetta da diritti di proprietà intellettuale nazionali e internazionali.

RNXtract® (Cerca Biotech GmbH), LightCycler® (Roche) e cobas z® (Roche), RNeasy® (QIAGEN), MicroAmp® (Life Technologies), NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific) e Versant® (Siemens), Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific), CFX96™ (Bio-Rad), MX3000P® (Agilent), HandyStep® (Brand Biotechnologie GmbH), BIO-CERT® (Brand Biotechnologie GmbH), Multipette® (Eppendorf) e Combitips advanced® (Eppendorf) sono marchi protetti delle rispettive aziende.

Nomi registrati, marchi, ecc. usati nel presente documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati privi della protezione della legge.

Cerca Biotech non concede alcuna licenza, espressa o implicita, in base a qualsiasi propria proprietà intellettuale per utilizzare i componenti inclusi nel kit per qualsiasi scopo diverso da quello descritto nelle presenti istruzioni per l'uso.

Cerca Biotech declina ogni garanzia, espressa o implicita, per l'uso dei componenti contenuti nel kit per scopi diversi da quelli espressamente indicati nelle presenti istruzioni per l'uso.

I kit e i relativi componenti sono destinati esclusivamente al numero di usi specificati al punto "4.1 Materiali e reagenti forniti" e inoltre non devono essere riutilizzati o ricondizionati.

© 2021 Cerca Biotech GmbH; tutti i diritti riservati.