

## Gebruiksaanwijzing - MammaPrint FFPE Microarray

### Inleiding

De MammaPrint-test is een genexpressieprofiel om de klinische uitkomst van borstkankerpatiënten te voorspellen. De test werd ontwikkeld vanuit de gedachte dat de natuurlijke geschiedenis van een tumor wordt bepaald door de onderliggende regulerende genetische paden; bovendien kunnen genexpressieprofielen, naast de standaard klinische pathologie, de prognose en de respons op behandeling nauwkeuriger voorspellen.

Met behulp van een unbiased benadering werd de MammaPrint gen signature bepaald door een genome-wide analyse van 25.000 genen in monsters van onbehandelde primaire borsttumoren uit te voeren en de genactiviteitsprofielen van patiënten bij wie binnen 5 jaar geen afstandsmetastase optrad, te vergelijken met die van patiënten bij wie dit wel het geval was. Dit resulteerde in een 70-genenprofiel dat onderscheid kon maken tussen patiënten met een hoog risico op het ontwikkelen van metastasen en patiënten bij wie het risico op afstandsmetastasen op lange termijn zo laag was dat een systemische behandeling weinig tot geen absoluut klinisch voordeel zou opleveren. <sup>(1,2)</sup>

*Risico op recidief* - De MammaPrint-test analyseert de expressie van 70 specifieke genen in een weefselmonster door RNA geïsoleerd uit borsttumormonsters op speciale microarray slides aan te brengen. Het expressieprofiel wordt vervolgens gebruikt in een proprietary algoritme om de patiënt categorisch te classificeren als een patiënt met een Hoog of Laag risico op terugkeer van borstkanker.

### ***Beoogd gebruik***

---

MammaPrint® FFPE is een kwalitatieve, niet-geautomatiseerde in vitro diagnostische test, uitgevoerd in het gespecialiseerde laboratorium van Agendia (Agendia's Diagnostic Service Laboratory), die gebruik maakt van het genexpressieprofiel verkregen uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) weefselmonsters van borstkanker om het risico van een patiënt op afstandsmetastase binnen 5 jaar te beoordelen.

MammaPrint biedt prognostische informatie over het risico van patiënten op een afstandsmetastase en voorspelt de omvang van het voordeel van een systemische behandeling ter ondersteuning van behandelbeslissingen bij patiënten met borstkanker.

De MammaPrint-genen meten de kenmerken van de meerstappenontwikkeling van borstkankercellen om te overleven, te prolifereren, zich te verspreiden en te metastaseren, zoals ontdekt binnen de kenmerken van kanker (Hallmarks of Cancer)<sup>(3)</sup>.

De test wordt uitgevoerd bij vrouwelijke borstkankerpatiënten met ziekte in stadium I of stadium II die lymfekliernegatief zijn of lymfeklierpositief met maximaal 3 positieve lymfeklieren, met een tumorgrootte kleiner dan of gelijk aan 5,0 cm, en bij patiënten met de ziekte in stadium III. Het resultaat van de MammaPrint® FFPE is uitsluitend bedoeld voor gebruik door artsen en dient samen met andere klinisch-pathologische factoren te worden geïnterpreteerd.

### ***Beoogde gebruiker***

---

Het is de bedoeling dat de MammaPrint FFPE microarray wordt aangevraagd door een zorgverlener van de borstkankerpatiënt. Door de MammaPrint FFPE microarray te bestellen, verzoekt de zorgverlener Agendia om zijn monster te testen in Agendia's Diagnostic Service Laboratory.

## **Testprincipe**

---

De analyse is gebaseerd op verschillende niet-geautomatiseerde processen: isolatie van RNA uit FFPE-weefselcoupes van borstkanker; reverse transcription van RNA resulterend in cDNA; amplificatie en labeling van het cDNA; hybridisatie van het geamplificeerde en gelabelde cDNA op de diagnostische microarray; wassen en scannen van de diagnostische microarray en gegevensvastlegging (feature extraction); berekening en bepaling van het risico op recidief (MammaPrint).

De MammaPrint-analyse is bedoeld om de activiteit van specifieke genen in een weefselmonster te bepalen. Het resultaat is een expressieprofiel, of 'vingerafdruk', van het monster. Aan de hand van dit expressieprofiel wordt de MammaPrint-index berekend en het moleculaire profiel van het monster bepaald (Laag Risico, Hoog Risico).

## **Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen**

---

De patiëntidentificatie op het aanvraagformulier moet correct overeenkomen met de identificatie van het monster in het LIMS-systeem, dat een interne identificatiecode creëert die in het laboratoriumproces correct aan het monster moet worden gekoppeld.

Vul het testaanvraagformulier in met de juiste informatie.

Het voor de MammaPrint-test geselecteerde monster moet overeenkomen met de kenmerken van de beoogde gebruikspopulatie, zoals, maar niet beperkt tot, borstkanker bij vrouwen, in een vroeg stadium en met een tumorcelpercentage van ten minste 30%.

De uitslagen van MammaPrint kunnen door artsen worden gebruikt als moleculair profiel naast de standaard klinisch-pathologische factoren. De test is niet bedoeld om de uitkomst van een ziekte te bepalen.

Een MammaPrint Laag Risico-uitslag garandeert niet dat een recidief op afstand zich binnen vijf jaar niet zal voordoen, net zo min als een Hoog Risico-uitslag garandeert dat een recidief op afstand zal optreden. De testuitslagen moeten worden gebruikt in combinatie met klinisch-pathologische factoren.

## **Procedure**

---

### **a) Selectie van patiënten**

Patiënten komen in aanmerking als ze vrouw zijn en de diagnose borstkanker in stadium I, stadium II of stadium III, lymfekliernegatief en lymfeklierpositief (maximaal 3 positieve lymfeklieren) hebben, met een tumorgrootte van  $\leq 5,0$  cm, onafhankelijk van de oestrogeenreceptorstatus (ER+/-).

### **b) Monsterafname, -registratie en -verzending.**

De voorwaarden voor het verzamelen, behandelen en prepareren van het monster worden via de gebruiksaanwijzing (IFU) aan de klant meegedeeld: MKT-067. Deze kit bevat het volgende:

- 10 Objectglasjes
- 2 Houders voor vijf objectglasjes
- Kleine en grote plastic zak met rits

- Instructies voor monsterafname
- Testaanvraagformulier
- Etiketvel met barcode-etiketten
- Verzendingmateriaal

De registratie van het monster wordt in gang gezet door middel van een kennisgeving van de opdrachtgevende zorgverlener. Deze melding (via het testaanvraagformulier, TRF) kan plaatsvinden via de online klantenportal of een ander communicatiekanaal waar Agendia alle gerelateerde monster- en patiëntinformatie registreert. Een TRF mag slechts voor één patiënt per keer worden gebruikt. Het monster wordt door de aanvragende zorgverlener rechtstreeks naar Agendia's Diagnostic Service Laboratory verzonden, bij omgevingstemperatuur, gebruikmakend van het bijgeleverde materiaal voor verzending per koerier.

### ***c) Monsteranalyse bij Agendia***

Er wordt gebruik gemaakt van FFPE-weefselcoupes, hetzij door de klant geleverd op objectglaasjes, hetzij geprepareerd van FFPE-tumorblokken, met behulp van een standaard microtoom. Totaal RNA wordt uit de weefselcoupes geëxtraheerd met behulp van een standaard in de handel verkrijgbare isolatiekit. Het RNA-monster wordt gezuiverd, geamplificeerd en gelabeld met een fluorescerende cyanine-CTP/dUTP-kleurstof.

Het RNA/cDNA-monster wordt gehybridiseerd op een speciaal ontworpen diagnostische microarray (8-pack, Agilent Technologies). Een Agilent-microarray scanner wordt gebruikt voor het scannen van de diagnostische microarray en het resultaat is een scanbestand (TIFF). Dit bestand wordt gebruikt door de Agilent Feature Extraction Software. De Feature Extraction Software analyseert het scanbestand (TIFF) door de relatieve fluorescentie-intensiteit van de afzonderlijke kenmerken te bepalen ten opzichte van het ontwerpbestand van de diagnostische microarray-chip als template, om controle features, normaliserings features en reporter gen features te identificeren. De fluorescentie-intensiteit van de kenmerken is een maat voor de expressie van bepaalde genen.

### ***d) Data analyse***

De data analyse wordt uitgevoerd volgens het MammaPrint-algoritme, dat de MammaPrint-index en het moleculaire profiel van het monster bepaalt (Laag Risico, Hoog Risico). Monsters met een MammaPrint-indexwaarde groter dan 0 worden geclassificeerd als laag risico, en monsters met een waarde kleiner dan of gelijk aan 0 worden geclassificeerd als hoog risico.

De MammaPrint-index van een monster kan vallen binnen een vooraf bepaald gebied rond de classificatie threshold tussen een MPI van  $> -0,05$  en  $<0,05$ , waarbij het resultaat van de MammaPrint  $<90\%$  classificatienauwkeurigheid heeft, maar niet minder dan  $50\%$  (d.w.z. een grenswaardemonster).

Er worden uitgebreide kwaliteitscontroles ( $>25$ ) uitgevoerd om een correct analyseresultaat te garanderen. De kwaliteitscontroles worden samen met de uitslag intern beoordeeld en goedgekeurd door de Laboratory Director.

### ***e) Rapportage***

De aanvragende zorgverlener ontvangt een patiëntenrapport en een samenvatting van de resultaten voor elke bestelde MammaPrint FFPE microarray-test. Met betrekking tot persoonsgegevens van patiënten verwijzen we u naar onze voorwaarden voor gegevensverwerking in het Privacybeleid van Agendia.

### ***Beperkingen van de procedure***

MammaPrint is uitsluitend gevalideerd voor gebruik met tumorweefsel van vrouwelijke borstkanker. Testen van andere soorten monsters kunnen onjuiste of geen resultaten opleveren. Betrouwbare resultaten zijn afhankelijk van de juiste procedures voor monsterafname en vervoer.

MammaPrint is specifiek gevalideerd voor de tumortypen invasief ductaal carcinoom of lobulair carcinoom. Het testen van andere soorten monsters (bijv. lymfeklieren) is niet beoordeeld.

### **Verwachte waarden**

---

De uitslag van de MammaPrint is een binair resultaat en wordt gecategoriseerd als 'Laag Risico' of 'Hoog Risico' op recidief. Het moleculaire profiel van een monster wordt bepaald door de MammaPrint Index (MPI) te berekenen op een schaal van -1.000 tot +1.000.

Net als elke andere test heeft ook onze test een vastgestelde classificatie threshold. Voor MammaPrint is de drempel voor Laag en Hoog Risico op nul gesteld om de hoogst mogelijke gevoeligheid te bereiken, en worden waarden  $>0,000$  geclassificeerd als Laag Risico, en waarden  $\leq 0,000$  als Hoog Risico. De algehele gemiddelde nauwkeurigheid van MPI is 98,5%, waarbij de scores  $< 0,1685$  of  $>0,168$  een nauwkeurigheid van  $>99\%$  hebben.

#### *'Borderline' MPI-waarden (grenswaarden)*

Hoewel de technische nauwkeurigheid van MammaPrint zeer hoog is, hebben monsters met een MPI-waarde zeer dicht bij de nul threshold een iets lager nauwkeurigheidspercentage dan monsters die verder van de threshold af liggen. Met name rond de nul drempel, tussen een MPI van  $> -0,05$  en  $<0,05$ , ook wel het 'grensgebied' (*borderline region*) genoemd, daalt de testnauwkeurigheid tot onder de 90%. Bijvoorbeeld, bij een MPI van 0,04 is er 86% zekerheid dat de MP-uitslag in het positieve bereik ligt (laag risico), en 14% kans dat deze in het negatieve bereik ligt (hoog risico). Het is belangrijk op te merken dat monsters met MPI-waarden buiten het 'grensgebied' een gemiddelde nauwkeurigheid van  $> 99\%$  hebben.

### **Prestatiekenmerken**

---

De voor MammaPrint onderzochte prestatiekenmerken zijn: precisie en reproduceerbaarheid, reportable range en classificatie threshold, analytische specificiteit en Limit of Detection.

#### Analytische prestaties

De concordantie van de uitslagen van de verse en FFPE-weefsels werd beoordeeld in twee onderzoeken en bleek 91,5% (n=221) en 94,3% (n=345) te zijn, zonder bias in de MammaPrint-uitslagen tussen beide weefseltypen. MammaPrint is ook stabiel tussen verschillende isolaties waarbij geen significant verschil werd waargenomen ( $p=0,994/p=0,290$ ), verschillende locaties en verschillende scanners, en vertoont een hoge precisie (97,3%), reproduceerbaarheid (96%) en herhaalbaarheid (97,8%)<sup>(4)</sup>.

Daarnaast werd voor de full genome (FG) array geen verschil gevonden tussen de uitslagen van herhaalde RNA-isolaties, de precisie (98,47%) reproduceerbaarheid (97,73%) en herhaalbaarheid (98,74%) en de overeenkomst tussen 8pack- en FG-array uitslagen van twee afzonderlijke datasets bleek 98,52% (n = 135) en 94,27% (n = 698) te zijn.

Het reportable range van de MammaPrint-index is ingesteld op waarden van -1,00 tot + 1,00 en de MammaPrint Index (MPI) classificatie threshold is ingesteld op +0,0. Een MPI lager dan of gelijk aan 0,0 wordt geclassificeerd als Hoog Risico, een MPI boven 0,0 wordt beschouwd als Laag Risico <sup>(1, 2, 4)</sup>.

Er is een interferentiestudie uitgevoerd op de volledige full genome (FG-array) om te beoordelen of vier relevante stoffen interfereren met de MammaPrint FFPE-uitslagen. De uitslagen toonden aan dat DNA-verontreiniging tot 2,5x de achtergrondniveaus en eiwitpieken tijdens RNA-isolatie, evenals ethanol en carry-over van AMPure XP Beads tijdens cDNA-zuivering geen invloed hadden op de MammaPrint-uitslagen. Over het algemeen hebben interfererende weefselcomponenten geen invloed op de MammaPrint-index, omdat de oorspronkelijke tumorserie representatief was voor borstkankermonsters en ook hier waren de andere weefselcomponenten willekeurig verdeeld en niet gerelateerd aan een ziekte-uitkomst <sup>(1)</sup>.

Om de Limit of Detection (LoD) te beoordelen werden de MammaPrint FFPE-uitslagen vergeleken over de verschillende verdunningen en deze lieten zeer stabiele uitslagen zien, zelfs bij zeer lage input van cDNA op de array. Op basis van de uitslagen is de detectiegrens voor de input van cDNA 900 ng. Daarnaast bleek uit een afzonderlijk onderzoek dat de LoD voor RNA-input 8,24 ng bedroeg.

#### Klinische validatie

De uitslagen zijn gebaseerd op eerder gepubliceerde gegevens voor het 70-genen moleculaire profiel<sup>(1)</sup> bij borsttumoren. Patiënten met een goede uitslag krijgen de classificatie Laag Risico (d.w.z. geen afstandsmetastasen binnen ten minste 5 jaar). Patiënten met een slechtere uitslag krijgen de classificatie Hoog Risico (d.w.z. met een grotere kans op afstandsmetastasen binnen 5 jaar). De numerieke MammaPrint Index-waarde wordt verstrekt.

MammaPrint werd ontwikkeld met gebruikmaking van adjuvante onbehandelde, lymfekliernegatieve, hoofdzakelijk Europese patiënten om de biologie van de primaire tumor vast te leggen in een genexpressieprofiel.<sup>(1,2)</sup> In januari 2013 werden de vijfjaarsuitkomsten van het prospectieve, observationele RASTER-onderzoek gepubliceerd<sup>(4)</sup>. Deze impactstudie was een biomarker-centrisch onderzoek - een 'eerste in zijn soort' - waarin de MammaPrint Fresh-test werd uitgevoerd en gerapporteerd bij 427 patiënten met een vroeg stadium van borstkanker van 18-61 jaar, pT1 en pT2, lymfekliernegatief, ER+/-, HER 2 +/- voorafgaand aan de gezamenlijke beslissing van arts en patiënt inzake adjuvante therapie. De patiënten werden behandeld volgens de richtlijnen voor standaardpraktijken, rekening houdend met alle relevante klinisch-pathologische factoren en de resultaten van de MammaPrint signature.

Vervolgens werd MammaPrint ook uitgevoerd op FFPE-weefsel van de RASTER-patiënten. De resultaten van MammaPrint werden vergeleken aan de hand van 345 gepaarde Fresh en FFPE RASTER-monsters met vijfjaarsuitkomsten. Zonder rekening te houden met andere covariaten dan de uitslag van de MammaPrint-test van de patiënt, vertoonden patiënten die door de MammaPrint FFPE als 'Laag Risico' werden geclassificeerd (71 adjuvant behandeld en 108 niet adjuvant behandeld), een kans van 1,3% (95% CI 0 - 3,1) op terugkeer van de kanker binnen 5 jaar<sup>(6)</sup>.

Patiënten die door de MammaPrint FFPE als 'Hoog Risico' werden geclassificeerd (145 adjuvant behandeld en 21 niet adjuvant behandeld), vertoonden een kans van 11,7% (95% CI 6,6 - 16,8) op terugkeer van de kanker binnen 5 jaar<sup>(6)</sup>.

MammaPrint is onafhankelijk gevalideerd in onderzoeken onder meer dan 75.000 borstkankerpatiënten met uitslagen die internationaal zijn gepubliceerd in toonaangevende peer-reviewed medische en wetenschappelijke

tijdschriften en waarvan is aangetoond dat ze informatie verschaffen die onafhankelijk is van de klinisch-pathologische risicobeoordeling <sup>(6,7)</sup>.

### **Testen bestellen**

---

Uw Agendia-contactpersoon zal u een monsterafnamekit verstrekken. Gebruik de kit en breng het tumormonster volgens de instructies aan op de objectglasjes, of prepareer een FFPE-blok. Plaats uw bestelling via onze onlineportal of door het testaanvraagformulier in te vullen dat bij de monsterafnamekit zit. Details zijn te vinden in de gebruiksaanwijzing (IFU) van deze kit.

Indien u aanvullende ondersteuning of informatie wenst, neem dan contact met ons op via [Customerservice@agendia.com](mailto:Customerservice@agendia.com) of +31 (0)20 462 1510.

### **Literatuurverwijzing**

---

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

### **Adviserende kennisgeving:**

Meld elk ernstig incident in verband met MammaPrint FFPE aan de fabrikant en aan de bevoegde autoriteit. De fabrikant zal het ernstige incident melden aan de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker/patiënt gevestigd is.

### **Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)**

Accreditatie certificaten: Agendia, Inc.: 05D1089250

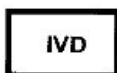
## Productie-informatie



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

Agendia's Diagnostic Service Laboratory adres  
Agendia, Inc.:  
22 Morgan,  
Irvine, CA 92618, VS  
Telefoon: +1 888 321 2732  
Fax: +1 866 756 7548  
[www.agendia.com](http://www.agendia.com)

Basic UDI-DI: 0850024841MammaPrintK9



© 2021 Agendia, NV. Alle rechten voorbehouden. Agendia, het Agendia-logo en MammaPrint zijn geregistreerde handelsmerken van Agendia, NV.

MKT-517-V2

Datum van uitgifte: februari 2025

### Wijzigingen ten opzichte van de vorige versie

Versie 2 - Uitbreiding van beoogd gebruik, update van analytische prestaties, literatuurverwijzing, waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Eerste uitgave – 03 november 2022