

Agendia NV.

MammaPrint® and BluePrint® Breast Cancer Recurrence and Molecular Subtyping Kit & ADAPT Software - Gebruiksaanwijzing

Gerichte sequencing van RNA uit met formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes om het recidiefrisico en het moleculaire subtype van borstkanker te bepalen



Document-ID: **MKT-339 v7**

Ga naar <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/> om dit document in andere talen te bekijken

Inhoud

Beoogd gebruik/Doel	3
Samenvatting en uitleg van de test.....	4
Wat er gemeten en gedetecteerd wordt.....	4
Principe van de procedure	4
Reagentia	5
Meegeleverde reagentia	5
Benodigde reagentia en apparatuur, niet bijgeleverd	6
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	7
Bewaring en hantering	8
Monsterafname en voorbereiding voor analyse	9
Kwaliteitscontrole	9
Analytische kwaliteitsbeoordeling	10
QC 1: Kwaliteitsbeoordeling (QC) van gezuiverd totaal FFPE RNA	10
QC 2: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, adapter-geligeerde cDNA-libraries.....	10
QC 3: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, doelverrijkte geïndexeerde libraries	10
Testcontroles	10
Testprocedure.....	10
Stap 1: Beoordeling en voorbereiding van FFPE RNA-kwaliteit.....	12
Stap 2: Agendia NGS library-voorbereiding	12
Stap 3: Agendia NGS doelverrijking	18
QC 3: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, doelverrijkte geïndexeerde libraries	24
Stap 4: Agendia NGS MiSeq Loading.....	26
Stap 5: Analyse van FASTQ-bestanden via ADAPT.....	29
Resultaten	30
Interpretatie van resultaten.....	30
MammaPrint	30
BluePrint	32
Beperkingen van de procedure.....	32
Verwachte waarden.....	33
MammaPrint	33

BluePrint	33
Prestatiekenmerken.....	34
MammaPrint	34
BluePrint	35
Assistentie	37
Datum van uitgifte	37
Adviserende kennisgeving:	38
Bibliografie	40
Bijlage A: Nucleotide-sequenties van MammaPrint BluePrint NGS 8bp -indices	42

MammaPrint® Blueprint® Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker

Beoogde gebruiker

Voor professioneel laboratoriumgebruik.

Voordat de test routinematig mag worden uitgevoerd, dienen de laboratoria het opleidings- en introductieprogramma van Agendia te volgen. Na succesvolle afronding wordt een certificaat uitgereikt.

LEES VOOR GEBRUIK ALLE INSTRUCTIES ZORGVULDIG DOOR.

Beoogd gebruik/Doel

De MammaPrint Blueprint Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker is een kwalitatieve, niet-geautomatiseerde in vitro diagnostische test, voor gebruik door klinische laboratoria, die gebruik maakt van next generation sequencing (NGS) met doelverrijking, voor genexpressiebeoordeling op met formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) weefselmonsters van borstkanker om het risico van een patiënt op afstandsmetastase te beoordelen en het moleculaire subtype vast te stellen. Dit hulpmiddel is alleen voor professioneel laboratoriumgebruik.

MammaPrint en Blueprint bieden informatie met betrekking tot het voorspellen van de omvang van het voordeel van een systemische behandeling ter ondersteuning van behandelbeslissingen bij patiënten met borstkanker.

De MammaPrint- en Blueprint-genen meten de kenmerken van de meerstappenontwikkeling van borstkankercellen om te overleven, te prolifereren, zich te verspreiden en te metastaseren, zoals beschreven binnen de kenmerken van kanker (Haan et.al, 2021) [1].

De 70-genen MammaPrint test is bedoeld om patiënten te onderscheiden die een laag dan wel hoog risico lopen om binnen 5 jaar na de diagnose afstandsmetastasen te ontwikkelen [2] [3] [4]. De Blueprint 80-genentest is bedoeld om het moleculaire subtype van borstkanker vast te stellen en te bepalen of tumoren van het lumbinale type, het HER2-type of het basale type zijn [5].

De MammaPrint Blueprint NGS Kit 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 MammaPrint en Blueprint is uitsluitend bedoeld voor gebruik door artsen samen met andere klinisch-pathologische factoren [6]. De MammaPrint Blueprint NGS Kit wordt uitgevoerd op het Illumina® MiSeq® Sequencer System en de resultaten worden geanalyseerd met de Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT).

Samenvatting en uitleg van de test

Wat er gemeten en gedetecteerd wordt

De MammaPrint BluePrint NGS Kit levert een geïndividualiseerd resultaat op met een laag of hoog risico op terugkeer van de ziekte, evenals een geïndividualiseerde bepaling van het moleculaire subtype van een tumor.

MammaPrint bepaalt de activiteit van 70 genen in een tumormonster, wat resulteert in een expressieprofiel of 'vingerafdruk' van de tumor. Met behulp van een gepatenteerd algoritme wordt het genexpressieprofiel gebruikt om de MammaPrint Index (MPI) te berekenen, die het prognostische profiel aangeeft voor het risico op terugkeer van borstkanker.

BluePrint bepaalt de activiteit van 80 genen in een tumormonster, wat resulteert in drie expressieprofielen. Met behulp van een gepatenteerd algoritme worden de drie genexpressieprofielen gebruikt om BluePrint-indices te berekenen die worden gebruikt om het moleculaire subtype van het monster te bepalen: luminaal-type, HER2-type, of basaal-type. De genen en scoringsalgoritmen die voor de MammaPrint BluePrint NGS Kit worden gebruikt, zijn identiek aan die voor de MammaPrinten BluePrint test die in Agendia's Diagnostic Service Laboratory worden uitgevoerd, op basis van microarraytechnologie ([2] [3] [4] [7] [8] [9]).

Principe van de procedure

De MammaPrint BluePrint NGS Kit is een niet-geautomatiseerd laboratoriumproces dat gebruik maakt van capture sequencing om de genexpressie te bepalen in RNA dat geïsoleerd is uit FFPE-weefsel met een tumorcelpercentage van ten minste 30%.

De NGS Kit maakt de bereiding van doelgerichte NGS-libraries uit FFPE RNA mogelijk met behulp van het Agilent SureSelect^{XT} RNA- target enrichment systeem bij gebrek aan een ribosomale depletiestap. De workflow voor target enrichment maakt gebruik van ultralang 120-meer gebiotinyleerd cRNA target om MammaPrint- en BluePrint-genen te vangen en ze te verrijken vanuit een NGS-library van genomische fragmenten. Read-count gegevens die uit de sequentie output (in FASTQ-formaat) worden gegenereerd, worden gebruikt om de expressie niveaus van MammaPrint- en BluePrint-profielen te beoordelen en het rapporteren van testresultaten.

De sequentie output wordt veilig overgebracht naar het webportaal van Agendia, en de analyse wordt uitgevoerd met de Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT). Het resultaat van de MammaPrint test omvat de MPI, die wordt gerapporteerd op een schaal van -1,000 tot +1,000 en het prognostische profiel van het monster bepaalt: Laag Risico (MPI groter dan +0,000) of Hoog Risico (MPI kleiner dan of gelijk aan 0,000). De BluePrint testresultaten omvatten drie BluePrint-indices, en de hoogste index bepaalt het moleculaire subtype van het monster.

Reagentia

Meegeleverde reagentia

Catalogus nr. 931280 is geconfigureerd voor maximaal 16 reacties.

MammaPrint BluePrint NGS RNA Library Prep (Pre-PCR) Catalogus nr. 931281 [Doos 1 van 4]		-15 °C tot -25 °C
Onderdeel	Cat.nr.	Volume
Agendia NGS Fragmentation Mix	931281-01	304 µL
Agendia NGS 1 st Strand Master Mix	931281-02	140 µL
Agendia NGS 2 nd Strand + End Repair Enzyme Mix	931281-03	400 µL
Agendia NGS 2 nd Strand + End Repair Oligo Mix	931281-04	80 µL
Agendia NGS dA Tailing Master Mix	931281-05	320 µL
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	931281-06	80 µL
Agendia NGS Ligation Master Mix	931281-07	80 µL
Agendia NGS Forward PCR Primer	931281-08	60 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase	931281-10	16 µL
Agendia NGS Reverse PCR Primer	931281-11	16 µL
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml

MammaPrint BluePrint NGS Target Enrichment (Post-PCR Box 1) Catalogus nr. 931282 [Doos 2 van 4]		15 °C tot 30 °C
Onderdeel	Cat.nr.	Volume
Agendia NGS Hyb 1	931282-01	400 µL
Agendia NGS Hyb 2	931282-02	1,25 ml
Agendia NGS Hyb 4	931282-03	1,25 ml
Agendia NGS Binding Buffer	931282-04	13,2 ml
Agendia NGS Wash Buffer 1	931282-05	8 ml
Agendia NGS Wash Buffer 2	931282-06	24 ml
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml
Agendia NGS Elution Buffer	931282-08	5,8 ml
Agendia NGS Neutralization Buffer	931282-09	960 µL
MammaPrint BluePrint bijsluiter	931282-10	1x

MammaPrint BluePrint NGS Target Enrichment (Post-PCR Box 2) Catalogus nr. 931283 [Doos 3 van 4]		-15 °C tot -25 °C
Onderdeel	Cat.nr.	Volume
Agendia NGS Indexing Block 1	931283-01	45 µL
Agendia NGS Block 2	931283-02	45 µL
Agendia NGS Indexing Block 3	931283-03	12 µL
Agendia NGS RNase Block	931283-04	18 µL
Agendia NGS Hyb 3	931283-05	160 µL
Agendia NGS Post-Cap PCR Primer	931283-06	16 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Agendia NGS 8bp Index Plate*	931283-07	12 µL

MammaPrint BluePrint NGS Panel Catalogus nr. 931284 [Doos 4 van 4]		-75 °C tot -85 °C
Onderdeel	Cat.nr.	Volume
MammaPrint BluePrint NGS Baits Library	931284	36 µL

* Indexsequenties zijn te vinden in [bijlage A: Nucleotide-sequenties van MammaPrint BluePrint NGS-indices](#)

Benodigde reagentia en apparatuur, niet bijgeleverd

Reagens	Fabrikant, catalogusnummer
RNA Isolation RNeasy FFPE Kit	QIAGEN, 73504
Actinomycine D	Afkomstig van Streptomyces sp. (Sigma-Aldrich, A1410)
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Invitrogen, 65601 of 65602
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter Genomics, A63880 of A63881 of A63882
MiSeq Reagent Kit v3 Kit (150 cycli)	Illumina, MS-102-3001
PhiX Control Kit V3	Illumina, FC-110-3001
Dimethylsulfoxide	Moleculair-biologische kwaliteit (Sigma-Aldrich, D8418)
Buffer EB	QIAGEN, 19086
Ethanol (EtOH), 100%	Moleculair-biologische kwaliteit (VWR, 1085430250)
Tween 20	Niet-ionisch (Sigma-Aldrich, P7949)
Nucleasevrij water	Nucleasevrij, gedeïoniseerd, zonder chemische additieven (QIAGEN,
Natriumhydroxide (NaOH)	1N, kwaliteit voor moleculaire biologie (Sigma-Aldrich, 72068)
Xyleen	Welke maar beschikbaar is
Histo-Clear	National Diagnostics, HS-200

Uitrusting	Minimumspecificaties
Analyseplatform en verbruiksgoederen voor nucleïnezuur	RNA DV200 200 nt-4000 nt DNA 150 bp-550 bp (Kwantitatieve gevoeligheid 0,5-50 ng/μl) DNA 150 bp-700 bp (Kwantitatieve gevoeligheid 5-500 pg/μl)
Vortexmixer	Welke maar beschikbaar is
Centrifuge	Voor 1,5 ml/0,5 ml buisjes
Plaatcentrifuge	Geschikt voor MIDI-platen van 0,8 ml
Vacuümcentrifuge	Temperatuurbereik: 15 °C tot 45 °C
Warmteblokken	37 °C voor 0,8 ml MIDI-plaat
Thermische mixer	27 °C en 65 °C
Timer	NIST traceerbaar
Magnetische standaard	Geschikt voor 0,80 ml platen (Life Technologies, AM10027) Geschikt voor 0,2 ml 8-strip buisjes (Life Technologies, 12331D) Geschikt voor 1,5/2 ml buisjes (Life Technologies, 12321D)
Thermische cycler	Verwarmd deksel: 105 °C
Eenkanaals pipetten	1 μl – 1000 μl
8-strip buisjes/centrifuge	Welke maar beschikbaar is
Meerkanaals pipetten (<i>optioneel</i>)	1 μl – 1000 μl
Repeater-pipetten (<i>optioneel</i>)	1 μl – 10 μl
MiSeq-systeem	Illumina, SY-410-1003 of Illumina, DX-410-1001 RUO mode

*Opmerking: De hierboven vermelde reagentia en algemene apparatuur zijn door Agendia gevalideerd voor gebruik in combinatie met de MammaPrint Blueprint NGS Kit. Uit deze validaties is gebleken dat de combinatie van deze reagentia, algemene apparatuur en de NGS Kit een veilige en goed presterende combinatie is (zie hoofdstuk Prestatiekenmerken).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

- Voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
- Dit hulpmiddel is uitsluitend bestemd voor gebruik door professionele laboratoria, opgeleid en gecertificeerd door Agendia.
- De resultaten van de MammaPrint BluePrint Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker zijn uitsluitend bedoeld voor gebruik door artsen in combinatie met standaard klinisch-pathologische factoren. De test is niet bedoeld om de uitkomst van een ziekte te bepalen.
- Gebruik het apparaat met FFPE- (met formaline gefixeerde in paraffine ingebedde) monsters van vrouwelijk borstkankerweefsel.
- Gebruik de inhoud van de kit niet na de houdbaarheidsdatum die op de buitenkant van de doos is gedrukt.
- Verwissel geen testcomponenten van verschillende kit partijen. De partijnummers van de kits worden op het etiket van de doos vermeld.
- Bewaar de onderdelen van de kit bij de aangegeven temperaturen in de daarvoor bestemde pre- en post-amplificatiezones.
- Om nauwkeurige resultaten te verkrijgen, moet u de instructies van de testprocedure nauwgezet opvolgen. Het niet opvolgen van de instructies, wijzigen van de instructies van het testsysteem of gebruik van reagentia of instrumenten of analyse- en rapportagemiddelen die niet door Agendia worden aanbevolen, kan de testresultaten ongeldig maken. Het niet opvolgen van de instructies voor deparaffineren, RNA-isolatie, doelverrijking of sequentiëring kan de testresultaten ongeldig maken.
- Het invasieve tumorcelpercentage moet ten minste 30% bedragen, aangezien dit vereist is om geldige resultaten te verkrijgen.
- In het laboratorium worden geschikte processen voor de identificatie van weefsels en monsters toegepast om de integriteit van de monsters te waarborgen.
- RNA van ontoereikende of slechte kwaliteit kan onjuiste resultaten opleveren.
- Zorg dat u een specifieke training of begeleiding volgt als u geen ervaring hebt met RNA-isolatie of next-generation sequencing procedures.
- Voor informatie over milieu, gezondheid en veiligheid wordt verwezen naar de veiligheidsinformatiebladen (SDS) op <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>.
- Gebruik de normale laboratoriumvoorzorgsmaatregelen. Niet met de mond pipetteren. Niet eten, drinken of roken op aangewezen werkplekken in het laboratorium. Draag wegwerphandschoenen en laboratoriumjassen bij het hanteren van monsters en testreagentia. Handen grondig wassen na het hanteren van monsters en testreagentia.
- Actinomycine D wordt verkregen als vaste stof en bereid in een concentratie van 4 µg/µl in DMSO en vervolgens opgeslagen in aliquots van 3 µl voor eenmalig gebruik bij -20 °C, beschermd tegen licht. De aliquots kunnen vóór gebruik tot een jaar worden bewaard. De 4 µg/µl Actinomycine D in DMSO wordt onmiddellijk vóór gebruik verdund met water tot een uiteindelijke Actinomycine D-concentratie van 120 ng/µl.
- OPMERKING: Actinomycine D, gebruikt in stap 2 van de procedure, is gevaarlijk – acute toxiciteit:

oraal, via de huid en bij inademing.



- Draag geschikte persoonlijke beschermingsmiddelen (PBM) wanneer u in het laboratorium werkt.



Bewaring en hantering

De inhoud van de kit is houdbaar tot de vervaldatum die op het etiket van omverpakking staat.

Bewaar de dozen bij de volgende temperaturen:

- Doos 1 en doos 3: tussen -15 °C en -25 °C
- Doos 2: tussen 15 °C en 30 °C. Niet in direct zonlicht bewaren.
- Doos 4: tussen -75 °C en -85 °C

Het hulpmiddel kan voor maximaal 16 reacties worden gebruikt. Reagentia zijn stabiel gedurende maximaal 5 vries- en dooicycli die plaatsvinden vóór de aangegeven vervaldatum op de doos.

De test moet worden uitgevoerd in een laboratorium op kamertemperatuur (tussen 15 °C en 25 °C).

Vóór gebruik krachtig schudden en vervolgens visueel controleren of er geen precipitaten aanwezig zijn.

Zorg ervoor dat u 0,2 N NaOH dagelijks vers bereidt; dit is tot 12 uur stabiel wanneer het bij kamertemperatuur wordt bewaard.

Dagelijks vers 70% ethanol bereiden.

Neem de volgende best practices in acht bij het hanteren van PCR Clean-Up AMPure XP Beads en Library Streptavidin Beads:

- De PCR Clean-Up AMPure XP Beads mogen nooit worden ingevroren
- De AMPure XP Beads vóór gebruik ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen
- Vlak voor gebruik de beads schudden tot ze goed gesuspendeerd zijn en de kleur homogeen is
- Het monster grondig mengen nadat de Streptavidin Beads zijn toegevoegd door 10 maal op en neer te pipetteren
- Het korrel/monstermengsel incuberen bij kamertemperatuur gedurende de gehele aangegeven tijd

PCR-verontreiniging kan leiden tot onnauwkeurige en onbetrouwbare resultaten. Zorg ervoor dat in de ruimten vóór en na de amplificatie specifieke apparatuur aanwezig is (bijv. pipetten, pipettips, vortexmixer en centrifuge) om verontreiniging te voorkomen.

Kruisbesmetting vermijden. Zorg voor schone pipettips tussen verschillende monsters en tussen het opbrengen van verschillende reagentia. De monsters mengen met een pipet en de plaat centrifugeren wanneer dat is aangegeven. De platen niet schudden, tenzij anders aangegeven. Aerosolbestendige tips gebruiken om het risico van amplicon-versleping en kruisbesmetting van monster tot monster te beperken.

Afvalverwerking

Gebruikte reagentia als chemisch afval behandelen en weggooien in overeenstemming met de toepasselijke regionale, nationale en plaatselijke wet- en regelgeving. Voor informatie over milieu, gezondheid en veiligheid wordt verwezen naar de veiligheidsinformatiebladen (SDS) op <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>.

Het hulpmiddel bevat geen weefsel, cellen of stoffen van dierlijke, menselijke of microbiële oorsprong.

Monsterafname en voorbereiding voor analyse

De behandeling van weefsel vóór fixatie moet worden uitgevoerd volgens het professionele laboratoriumprotocol.

Selecteer het FFPE-tumorblok van vrouwelijk borstkankerweefsel voor elk te verwerken specimen en gebruik een weefselmonster dat de grootste hoeveelheid invasief carcinoom bevat en morfologisch in overeenstemming is met de gestelde diagnose. Het geselecteerde FFPE-tumorblok mag niet ouder zijn dan 5 jaar. Zorg ervoor dat het monster gedurende het hele proces een unieke identificatie heeft.

De opslag van het FFPE-monster dient plaats te vinden volgens het professionele laboratoriumprotocol.

Vervolgens moeten van elk weefselblok coupes van 5 µm voor 10 objectglaasjes worden gesneden, met op elk glaasje een seriële sectie van 5 µm. Het wordt aanbevolen om geladen objectglaasjes te gebruiken om de kans te verkleinen dat delen van het glaasje vallen. Eén objectglaasje wordt gebruikt voor hematoxyline- en eosinekleuring (H&E) om het percentage tumorcellen te bepalen en de overige glaasjes kunnen, afhankelijk van de grootte van het weefsel, geheel of gedeeltelijk worden gebruikt voor de RNA-isolatie. Deparaffineren moet plaatsvinden met Xyleen of Histo-Clear¹.

Het invasieve tumorcelpercentage moet ten minste 30% bedragen, aangezien dit vereist is om geldige resultaten te verkrijgen. Indien nodig en mogelijk kan een microdissectie worden uitgevoerd om grote gebieden met *in situ* carcinoom, necrose, vetweefsel, stroma en/of bloeding te vermijden, aangezien deze het totale percentage invasieve tumorcellen zullen verminderen.

Kwaliteitscontrole

De apparatuur die in de laboratoriumprocessen wordt gebruikt, naar behoren kalibreren en onderhouden overeenkomstig de standaard kwaliteitscontrolevoorschriften van uw laboratorium.

¹ Histo-Clear is getest voor gebruik met de MammaPrint Blueprint NGS-set.

Analytische kwaliteitsbeoordeling

QC 1: Kwaliteitsbeoordeling (QC) van gezuiverd totaal FFPE RNA

Deze QC beoordeelt de kwaliteit van het totale FFPE RNA op basis van de DV200 metric.

De DV200 wordt gemeten als het percentage RNA-fragmenten met een lengte tussen 200 nt en 4000 nt.

QC 2: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, adapter-geligeerde cDNA-libraries

Deze QC beoordeelt de kwaliteit (cDNA-fragmenten moeten in het juiste groottebereik vallen, d.w.z. tussen 150 en 550 bp) en de kwantiteit (ng/μl) van de adapter-geligeerde cDNA-library.

QC 3: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, doelverrijkte geïndexeerde libraries

Deze QC beoordeelt de kwaliteit (cDNA-fragmenten moeten binnen het juiste groottebereik vallen, d.w.z. tussen 150 en 700 bp), de hoeveelheid (pg/μl) en de molariteit (pmol/L) van de geamplificeerde, doelverrijkte geïndexeerde library.

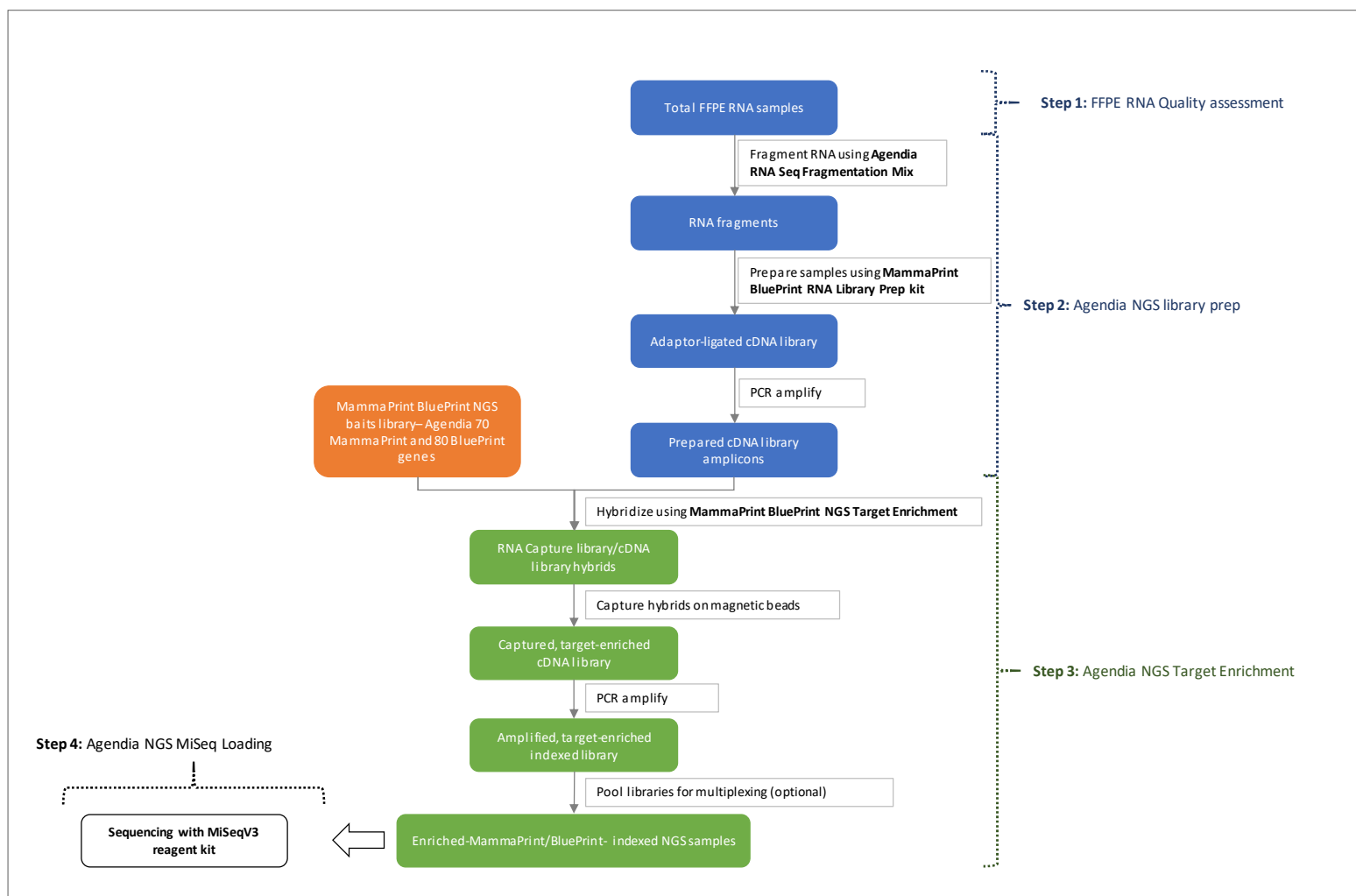
Testcontroles

Volgens goede laboratoriumpraktijken moet controlemateriaal worden geëvalueerd om technische procedureverschillen in het laboratorium van de gebruiker op te sporen die tot aanzienlijke variabiliteit of onnauwkeurigheden in de resultaten kunnen leiden.

Het wordt aanbevolen om vóór het eerste gebruik van deze test in het laboratorium van de gebruiker de prestaties van de test te verifiëren door verschillende monsters te testen waarvan de resultaten bekend zijn.

Testprocedure

Afbeelding 1 geeft een overzicht van de procedure.



Afbeelding 1: Overzicht van de procedure met de MammaPrint Blueprint NGS Kit

Stap 1: Beoordeling en voorbereiding van FFPE RNA-kwaliteit

De RNA-isolatie wordt uitgevoerd met de QIAGEN RNeasy FFPE kit volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant. Geïsoleerd totaal RNA uit FFPE moet absorptieratio's voor 260/280 en 260/230 hebben die voor beide ratio's dicht bij 2,0 liggen. Ratio's die aanzienlijk afwijken van 2,0 kunnen wijzen op de aanwezigheid van organische of anorganische verontreinigingen, die wellicht verdere zuivering vereisen, of aangeven dat het monster niet geschikt is voor gebruik met de MammaPrint BluePrint NGS Kit.

Voordat u begint, bereidt u totaal RNA van elk monster voor in nucleasevrij water.

FFPE RNA kwaliteitsbeoordeling			
1.1	De DV200-waarde voor FFPE RNA-monsters bepalen met behulp van een geschikt analyseplatform voor nucleïnezuurfragmenten.		
	200 ng RNA per monster aliquoteren voor standaard, goede tot matige en slechte monsters.		
	Als er geen 200 ng beschikbaar is, dan de in de onderstaande tabel aangegeven hoeveelheid RNA aliquoteren.		
	Categorie	Spreidingswaarde (DV200)	Hoeveelheid RNA nodig voor library-voorbereiding
	Standaard	≥70% boven 200 nt	100 ng
	Goed tot matig	≥50% boven 200 nt	150 ng
	Slecht	≥20% boven 200 nt	200 ng
	Niet aanbevolen	<20% boven 200 nt	Niet aanbevolen

Stap 2: Agendia NGS library-voorbereiding

RNA-fragmentatie en primerontharding	
2.1	Agendia NGS Fragmentation Mix op kamertemperatuur laten ontdooien, vervolgens op ijs plaatsen.
2.2	Agendia NGS First Strand Master Mix op ijs laten ontdooien.
2.3	Een vacuümcentrifuge (≤45 °C) gebruiken om het gealiquoteerde FFPE RNA te vriesdrogen. <u>Niet te lang laten drogen.</u>
2.4	Agendia NGS Fragmentation Mix gedurende 10 seconden schudden. FFPE RNA in 19 µl Agendia NGS Fragmentation Mix opnieuw suspenderen. Schudden en kort centrifugeren.
2.5	Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren voor monsters van standaard en goede/matige RNA-kwaliteit: Verwarmd deksel op 95 °C 1. 2 minuten op 94 °C 2. 3 minuten op 65 °C 3. Ten minste 1 minuut op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.
2.6	Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren voor monsters van slechte RNA-kwaliteit: Verwarmd deksel op 95 °C 1. 5 minuten op 65 °C 2. Ten minste 1 minuut op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.

Synthese van cDNA van de eerste streng		
2.7	Een verse 120 ng/μl Actinomycine D -verdunding voorbereiden volgens onderstaande tabel. Dit volume is voldoende voor 96 reacties.	
	Agendia NGS Nuclease-Free Water	97 μL
	Actinomycine D (4 μg/μl in DMSO)	3 μL
	Totaal volume	100 μL
	Het mengsel schudden, kort centrifugeren, bewaren bij kamertemperatuur en beschermen tegen licht.	
2.8	Agendia NGS First Strand Synthesis Mix voorbereiden volgens onderstaande tabel. Berekenen voor 1 extra reactie.	
	Opmerking: First Strand Master Mix 10 seconden schudden alvorens de diverse reagentia te combineren.	
	Reagens	Volume per reactie
	Actinomycine D (120 ng/μl in H₂O)	0,5 μl
	Agendia NGS First Strand Master Mix	8,0 μl
2.9	Totaal volume	8,5 μl
	Mengsel schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren.	
2.10	8,5 μl Agendia NGS First Strand Synthesis Mix , op ijs, toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe First Strand cDNA-plaat.	
2.11	Gefragmenteerd FFPE RNA overbrengen in de monsterputjes van de First Strand cDNA-plaat. De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren. Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Verwarmd deksel op 95 °C 1. 10 minuten op 25 °C 2. 40 minuten op 37 °C 3. Ten minste 3 minuten op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.	

Synthese van cDNA van de tweede streng en reparatie van de uiteinden		
2.12	Second Strand Synthesis and End Repair Mix voorbereiden volgens onderstaande tabel. Berekenen voor 1 extra reactie.	
	Opmerking: Alle reagentia gedurende 5 seconden schudden alvorens ze te combineren.	
	Reagens	Volume per reactie
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Enzyme Mix	25,0 μl
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Oligo Mix	5,0 μl
2.13	Totaal volume	30,0 μl
	Mengsel schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren.	
2.14	30 μl Second Strand Synthesis and End Repair Mix aan elk monsterputje toevoegen.	
2.15	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren. Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Geen verwarmd deksel gebruiken. Als het verwarmde deksel niet kan worden uitgeschakeld, moet het programma worden uitgevoerd met het deksel open. 1. 60 minuten op 16 °C 2. Ten minste 3 minuten op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.	

Gesynthetiseerd cDNA zuiveren met AMPure XP Beads	
2.16	AMPure XP Beads gedurende ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen. De beadsuspensie schudden tot deze homogeen is. Indien u verdergaat met het adenyleren van cDNA 3' uiteinden , dan Agendia NGS dA Tailing Master Mix op ijs laten ontdooien.
2.17	108 µl homogene beadsuspensie toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
2.18	Breng 57,5 µl monstermix over in de respectieve monsterputjes van de 0,8 ml 96-well MIDI-plaat.
2.19	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
2.20	De monsters 5 minuten op kamertemperatuur incuberen.
2.21	De plaat gedurende ten minste 5 minuten op een magnetische standaard op kamertemperatuur plaatsen.
2.22	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat, voorzichtig de helder geworden oplossing uit elk monsterputje verwijderen en weggooien. De beads niet aanraken bij het verwijderen van de oplossing.
2.23	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat 200 µl verse 70% ethanol in elk monsterputje gieten.
2.24	10 seconden wachten (of tot de oplossing helder is) om eventuele verstoorde beads te laten bezinken en dan voorzichtig de ethanol verwijderen.
2.25	Dit herhalen voor in totaal 2 wasbeurten.
2.26	Indien nodig kort de MIDI-plaat centrifugeren, de plaat terugplaatsen op de magnetische standaard en de resterende ethanol druppels met een pipet verwijderen.
2.27	De monsters gedurende 3 minuten drogen op het warmteblok, op 37 °C. Niet te lang laten drogen, maar ervoor zorgen dat alle ethanol verwijderd is.
2.28	21,5 µl nucleasevrij water toevoegen aan elk monsterputje.
2.29	De plaat afsluiten, goed schudden en kort centrifugeren om vloeistof op te vangen.
2.30	2 minuten incuberen op kamertemperatuur.
2.31	De MIDI-plaat op de magnetische standaard plaatsen en gedurende 5 minuten incuberen of tot de oplossing helder is.
2.32	20 µl van het helder geworden supernatant verwijderen en aan een nieuwe 96-well-plaat van 0,2 ml toevoegen.
Stoppunt: Indien u niet verdergaat met de volgende stap, de plaat afsluiten en bewaren tussen –15 °C en –25 °C.	

cDNA 3' uiteinden adenyleren							
2.33	Agendia NGS dA Tailing Master Mix op ijs laten ontdooien. Agendia NGS dA Tailing Master Mix gedurende 15 seconden op hoge snelheid schudden. 20 µl toevoegen aan elk monsterputje van de plaat met 20 µl helder geworden supernatans. Mengsel schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren.						
2.34	Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Geen verwarmd deksel gebruiken. Als het verwarmde deksel niet kan worden uitgeschakeld, moet het programma worden uitgevoerd met het deksel open. 30 minuten op 37 °C - Ten minste 3 minuten op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.						
Adapters ligeren							
2.35	Agendia NGS Ligation Master Mix in ijs laten ontdooien. Agendia NGS Oligo Adaptor Mix op ijs laten ontdooien. Adaptor Ligation bereiden volgens onderstaande tabel. Opmerking: Alle reagentia gedurende 10 seconden schudden.						
	<table> <tr> <th>Reagens</th><th>Volume per reactie</th></tr> <tr> <td>Agendia NGS Ligation Master Mix</td><td>5,0 µl</td></tr> <tr> <td>Agendia NGS Oligo Adaptor Mix</td><td>5,0 µl</td></tr> </table>	Reagens	Volume per reactie	Agendia NGS Ligation Master Mix	5,0 µl	Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	5,0 µl
Reagens	Volume per reactie						
Agendia NGS Ligation Master Mix	5,0 µl						
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	5,0 µl						

	<i>Totaal volume</i> 10,0 µl
	Mengsel schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren. Voor kleine monsterbatches kunnen de reagenscomponenten afzonderlijk aan elk monsterputje worden toegevoegd. Bij individuele toevoeging, Agendia NGS Ligation Master Mix langzaam pipetteren om ervoor te zorgen dat het volledige volume wordt afgegeven.
2.36	De Adenylate/Ligation-plaat op ijs plaatsen en vervolgens 10 µl van de Adaptor Ligation Mix aan elk monsterputje toevoegen. De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
2.37	Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Geen verwarmd deksel gebruiken. Als het verwarmde deksel niet kan worden uitgeschakeld, moet het programma worden uitgevoerd met het deksel open. 1. 15 minuten op 20 °C 2. Ten minste 3 minuten op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.

Adapter-geligeerd cDNA zuiveren met AMPure XP Beads	
2.38	AMPure XP Beads gedurende ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen. De beadsuspensie schudden tot deze homogeen is. Agendia NGS PCR Master Mix op kamertemperatuur laten ontdooien. Na het ontdooien in ijs plaatsen. Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG) , Agendia NGS Forward PCR Primer en Agendia NGS Reverse PCR Primer in ijs laten ontdooien.
2.39	90 µl homogene beadsuspensie toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
2.40	50 µl monsternmix overbrengen in de respectieve monsterputjes van de 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
2.41	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
2.42	De monsters 5 minuten op kamertemperatuur incuberen.
2.43	De plaat gedurende ten minste 5 minuten op een magnetische standaard op kamertemperatuur plaatsen.
2.44	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat, voorzichtig de helder geworden oplossing uit elk monsterputje verwijderen en weggoien. De beads niet aanraken bij het verwijderen van de oplossing.
2.45	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat 200 µl verse 70% ethanol in elk monsterputje gieten.
2.46	10 seconden wachten (of tot de oplossing helder is) om eventuele verstoorde beads te laten bezinken en dan voorzichtig de ethanol verwijderen.
2.47	Dit herhalen voor in totaal 2 wasbeurten.
2.48	Indien nodig kort de MIDI-plaat centrifugeren, de plaat terugplaatsen op de magnetische standaard en de resterende ethanol druppels met een pipet verwijderen.
2.49	De monsters gedurende 3 minuten drogen op het warmteblok, op 37 °C. De monsters niet te lang laten drogen, maar ervoor zorgen dat alle ethanol verwijderd is.
2.50	23 µl nucleasevrij water toevoegen aan elk monsterputje.
2.51	De plaat afsluiten, goed schudden en kort centrifugeren om vloeistof op te vangen.
2.52	2 minuten incuberen op kamertemperatuur.
2.53	De MIDI-plaat op de magnetische standaard plaatsen en gedurende 5 minuten incuberen of tot de oplossing helder is.
2.54	22 µl van het helder geworden supernatant verwijderen en aan een nieuwe 96-well-plaat van 0,2 ml toevoegen.

Amplificatie van adapter-geligeerde cDNA-library				
2.55	Pre-Capture PCR Mix voorbereiden op ijs volgens de onderstaande tabel			
	Opmerking: Agendia NGS PCR Master Mix reagens gedurende 30 seconden schudden alvorens te combineren.			
	<table> <tr> <th>Reagens</th><th>Volume per reactie</th></tr> <tr> <td>Agendia NGS PCR Master Mix</td><td>25,0 µl</td></tr> </table>	Reagens	Volume per reactie	Agendia NGS PCR Master Mix
Reagens	Volume per reactie			
Agendia NGS PCR Master Mix	25,0 µl			

	Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1,0 µl
	Agendia NGS Forward PCR Primer	1,0 µl
	Agendia NGS Reverse PCR Primer	1,0 µl
	<i>Totaal volume</i>	28,0 µl
	Mengsel schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren.	
2.56	28 µl van de Pre-Capture PCR Mix toevoegen aan elk monsterputje. De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.	

2.57	Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Verwarmd deksel op 95 °C 1. 15 minuten op 37 °C 2. 2 minuten op 95 °C 3. 30 seconden op 95 °C 4. 30 seconden op 65 °C 5. 1 minuut op 72 °C 6. Herhaal stap 3-5 voor in totaal 14 cycli. 7. 5 minuten op 72 °C 8. Ten minste 3 minuten op 4 °C Op 4 °C of op ijs bewaren tot u klaar bent om verder te gaan.
------	---

Geamplificeerd adapter-geligeerd cDNA zuiveren met AMPure XP Beads	
2.58	AMPure XP Beads gedurende ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen. De beadsuspensie schudden tot deze homogeen is.
2.59	90 µl homogene beadsuspensie toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
2.60	50 µl monstermix overbrengen in de respectieve monsterputjes van de 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
2.61	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
2.62	De monsters 5 minuten incuberen op kamertemperatuur.
2.63	De plaat gedurende ten minste 5 minuten op een magnetische standaard op kamertemperatuur plaatsen.
2.64	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat, voorzichtig de helder geworden oplossing uit elk monsterputje verwijderen en weggooien. De beads niet aanraken bij het verwijderen van de oplossing.
2.65	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat 200 µl verse 70% ethanol in elk monsterputje gieten.
2.66	10 seconden wachten (of tot de oplossing helder is) om eventuele verstoorde beads te laten bezinken en dan voorzichtig de ethanol verwijderen.
2.67	Dit herhalen voor in totaal 2 wasbeurten.
2.68	Indien nodig kort de MIDI-plaat centrifugeren, de plaat terugplaatsen op de magnetische standaard en de resterende ethanol druppels met een pipet verwijderen.
2.69	De monsters gedurende 3 minuten drogen op het warmteblok, op 37 °C. De monsters niet te lang laten drogen, maar ervoor zorgen dat alle ethanol verwijderd is.
2.70	26 µl nucleasevrij water toevoegen aan elk monsterputje.
2.71	De plaat afsluiten, goed schudden en kort centrifugeren om vloeistof op te vangen.
2.72	De monsters 2 minuten incuberen op kamertemperatuur.
2.73	De MIDI-plaat op de magnetische standaard plaatsen en gedurende 5 minuten incuberen of tot de oplossing helder is.
2.74	25 µl van het helder geworden supernatant verwijderen en aan een nieuwe 96-well-plaat van 0,2 ml toevoegen.
Stoppunt: Indien u niet verdergaat met de volgende stap, de plaat afsluiten en bewaren tussen –15 °C en –25 °C.	
Geamplificeerd adapter-geligeerd cDNA kwantificeren en normaliseren	
2.75	De geamplificeerde adapter-geligeerde pre-capture library kwantificeren met behulp van een geschikt platform voor fragmentanalyse van nucleïnezuur in het gebied tussen 150 bp-550 bp. In totaal 200 ng cDNA pre-capture library aliquoteren.
2.76	Met behulp van een vacuümcentrifuge de 200 ng cDNA pre-capture library lyofiliseren en reconstitueren in 3,4 µl nuclease-vrij water. <u>Niet te lang laten drogen</u> . Goed schudden en kort centrifugeren.
Stoppunt: Indien u niet verdergaat met de volgende stap, de buisjes bewaren tussen –15 °C en –25 °C.	

Stap 3: Agendia NGS doelverrijking

Library hybridiseren			
3.1	Een ijssemmer klaarzetten en de reagentia ontdooien zoals hieronder beschreven:		
	Mix A Hyb buffer	Mix B Voorbereide library	Mix C Capture library
	Agendia NGS Hyb nr. 1 KAMERTEMPERATUUR	Agendia NGS Indexing Block nr. 1 4 °C (ijs)	Agendia NGS RNase Block Alleen uit -20 °C verwijderen bij het maken van Mix C
	Agendia NGS Hyb nr. 2 KAMERTEMPERATUUR	Agendia NGS Block nr. 2 4 °C (ijs)	MammaPrint Blueprint NGS Baits Library 4 °C (ijs)
	Agendia NGS Hyb nr. 3 kamertemperatuur	Agendia NGS Indexing Block nr. 3 4 °C (ijs)	-
	Agendia NGS Hyb nr. 4 KAMERTEMPERATUUR	-	-
3.2	Library Mix A voorbereiden volgens onderstaande tabel, in een buisje van 1,5 ml bij kamertemperatuur.		
	Reagens	Volume per reactie	
	Agendia NGS Hyb nr. 1	6,63 µL	
	Agendia NGS Hyb nr. 2	0,27 µL	
	Agendia NGS Hyb nr. 3	2,65 µL	
	Agendia NGS Hyb nr. 4	3,45 µL	
	Totaal volume	13,0 µL	
Mengsel voorzichtig schudden, kort centrifugeren en op kamertemperatuur bewaren.			
3.3	Een nieuwe 8-strip buis voorbereiden en labelen als 'A', vervolgens per monster 13 µl Library Mix A in elk monsterputje aliquoteren. De strips bewaren op kamertemperatuur.		
3.4	Library Mix B voorbereiden volgens onderstaande tabel, in een buisje van 0,5 ml op kamertemperatuur.		
	Reagens	Volume per reactie	
	Agendia NGS Indexing Block nr. 1	2,5 µL	
	Agendia NGS Block nr. 2	2,5 µL	
	Agendia NGS Indexing Block nr. 3	0,6 µL	
	Totaal volume	5,6 µL	
Mengsel voorzichtig schudden, kort centrifugeren en op ijs bewaren.			
3.5	Een nieuwe 8-strip buis voorbereiden en labelen als 'B'. 1. Vervolgens 5,6 µl Library Mix B in elk monsterputje aliquoteren. 2. 3,4 µl monster toevoegen aan elk afzonderlijk monsterputje. 3. Voorzichtig mengen door 10 maal op en neer te pipetteren.		
3.6	De 8-strip buis met Library Mix B en monster op een thermocycler plaatsen en het volgende programma uitvoeren: <u>Het deksel verwarmen op 105 °C</u> ; volume ingesteld op 29 µl, indien van toepassing 1. 5 minuten op 95 °C 2. 5 minuten op 65 °C 3. Op 65 °C houden.		

3.7	Library Mix C voorbereiden volgens onderstaande tabel , in een buisje van 0,5 ml in ijs van 4 °C.	
	Reagens	Volume per reactie
	Agendia NGS Nuclease-Free Water	4,5 µL
	Agendia NGS RNase Block	0,5 µL
	MammaPrint Blueprint NGS Baits Library	2,0 µL
	Totaal volume	7,0 µL
	Voorzichtig mengen door op en neer te pipetteren. Controleren of er geen luchtbellens zijn. Opmerking: Mix C voorbereiden in de buurt van de 5 minutengrens op de 65 °C van stap 3.6. Het mengsel slechts kort op kamertemperatuur houden, totdat u mix A toevoegt aan mix C. Oplossingen die de MammaPrint Blueprint NGS Baits Library bevatten niet gedurende langere tijd op kamertemperatuur bewaren.	
3.8	Een nieuwe 8-strip buis als 'C' labelen en 7 µL Library Mix C aan elk monsterputje van de 8-strip buis toevoegen.	
3.9	13 µL Library Mix A in de 8-strip buizen van Library Mix C pipetteren. Goed mengen door 5 seconden te schudden en kort te centrifugeren. Het mengsel kort op kamertemperatuur houden, tot het gebruik in stap 3.10.	
3.10	Terwijl de thermocycler nog op 65 °C staat, de totale hoeveelheid Library Mix A+C in monsterputjes met Library Mix B pipetteren. Zorg ervoor dat het volledige volume van Library Mix A+C wordt overgebracht in Library Mix B .	
3.11	Voorzichtig mengen door 10 maal op en neer te pipetteren en het deksel sluiten. Als er luchtbellens aanwezig zijn, dan even centrifugeren.	
3.12	Zorg dat alle buisdoppen afgesloten zijn. Het deksel van de thermocycler sluiten en het vervolgprogramma uitvoeren: 1. 17-24 uur op 65 °C 2. Op 65 °C houden.	

Streptavidin Beads voorbereiden	
3.13	650 µL Agendia NGS Wash Buffer 2 per monster schudden en aliquoteren in 2 ml buisjes.
3.14	De gealiquoteerde buisjes gedurende ten minste 30 minuten in een warmteblok op 65 °C plaatsen.
3.15	Dynabeads MyOne Streptavidin-T1 beads gedurende ten minste 30 seconden schudden om samengeklonterde beads op te breken.
3.16	50 µL beads per monster aliquoteren in buisjes van 2 ml. (Maximaal 200 µL beads, voor 4 monsters, per buisje)
3.17	De Streptavidin Beads wassen: a. PER MONSTER 200 µL Agendia NGS Binding Buffer toevoegen aan het 2 ml buisje. (Maximaal 800 µL buffer, voor 4 monsters, per buisje) b. De beads gedurende 5 seconden goed mengen in een vortexmixer en kort centrifugeren. c. De buisjes van 2,0 ml gedurende 2 minuten op een magnetische separator plaatsen en de oplossing helder laten worden. d. Het supernatant verwijderen en weggooien. e. Stap a tot en met d herhalen voor in totaal 3 wasbeurten.
3.18	De beads resuspenderen in 200 µL Agendia NGS Binding Buffer per monster en aliquoteren in strips van 8 PCR-buizen.

Hybriden vangen met behulp van Streptavidin Beads
--

3.19	Terwijl de monsters op de thermocycler op 65 °C worden gehouden, 29 µl van de Hybridization Library 17-24 hours incubatie overbrengen in een 8-stripbuis met 200 µl gewassen Streptavidin Beads (gewassen Streptavidin Beads op kamertemperatuur houden).
3.20	De strip van 8 buisjes sluiten en mengen door omkeren en vervolgens snel centrifugeren.

3.21	Het monster incuberen op de thermische mixer op 27 °C bij 1400 rpm gedurende 30 minuten. Opmerking: De beads na 5 minuten controleren op klontering. Als de beads geklonterd zijn, het buisje snel schudden. Na de 30 minuten incubatie de thermische mixer instellen op 65 °C.
3.22	De buisjes centrifugeren.
3.23	De plaat gedurende 2 minuten op een magnetische separator plaatsen om de beads uit de suspensie te verzamelen.
3.24	Het supernatant verwijderen en weggooien.
3.25	De beads in 200 µl Agendia NGS Wash Buffer 1 resuspenderen door 5 seconden te mengen op een vortexmixer.
3.26	De monsters 15 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.27	De beads en de buffer gedurende 2 minuten scheiden op een magnetische separator en het supernatans verwijderen.
3.28	De beads wassen met Agendia NGS Wash Buffer 2 - De beads resuspenderen in 200 µl op 65 °C voorverwarmde Agendia NGS Wash Buffer 2. - De buisjes afsluiten en 5 seconden mengen met een vortexmixer om de beads te resuspenderen. Daarna kort centrifugeren. - Het buisjes gedurende 10 minuten incuberen op een thermische vortexmixer op 65 °C bij 1200 rpm. - De buisjes af en toe omkeren om te mengen als u merkt dat de beads bezinken. - De buisjes kort centrifugeren in een centrifuge of miniplaatcentrifuge. - De buisjes gedurende 2 minuten op een magnetische separator plaatsen. - Het supernatant verwijderen en weggooien. - Stap a tot en met g herhalen voor in totaal 3 wasbeurten.
3.29	De beads gedurende 5 seconden schudden in 31,5 µl Agendia NGS Elution Buffer om de beads te resuspenderen. Daarna kort centrifugeren.
3.30	De monsters 10 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.31	De beads en de buffer gedurende 2 minuten scheiden op een magnetische separator.
3.32	30 µl supernatant overbrengen naar een schone plaat. De beads weggooien.
3.33	30 µl Agendia NGS Neutralization Buffer toevoegen aan de captured cDNA-library.

De Captured Library zuiveren met AMPure XP Beads	
3.34	AMPure XP Beads gedurende ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen. De beadsuspensie schudden tot deze homogeen is. Als u doorgaat met 'De Captured Libraries amplificeren om indexlabels toe te voegen', dan Agendia NGS PCR Master Mix , Agendia NGS Post-Capture PCR Primer , en Agendia NGS 8bp Index Plate ontdooien en deze in ijs plaatsen.
3.35	108 µl homogene beadsuspensie toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
3.36	De 60 µl monstermix uit stap 3.33 toevoegen.
3.37	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
3.38	De monsters 5 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.39	De plaat gedurende ten minste 5 minuten op een magnetische standaard op kamertemperatuur plaatsen.

3.40	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat, voorzichtig de helder geworden oplossing uit elk monsterputje verwijderen en weggooien. De beads niet aanraken bij het verwijderen van de oplossing.
3.41	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat 200 µl verse 70% ethanol in elk monsterputje gieten.
3.42	10 seconden wachten (of tot de oplossing helder is) om eventuele verstoorde beads te laten bezinken en dan voorzichtig de ethanol verwijderen.
3.43	Dit herhalen voor in totaal 2 wasbeurten.
3.44	Indien nodig kort de MIDI-plaat centrifugeren, de plaat terugplaatsen op de magnetische standaard en de resterende ethanol druppels met een pipet verwijderen.
3.45	De monsters gedurende 3 minuten drogen op het warmteblok, op 37 °C. De monsters niet te lang laten drogen, maar ervoor zorgen dat alle ethanol verwijderd is.
3.46	36 µl nucleasevrij water toevoegen aan elk monsterputje.
3.47	De plaat afsluiten, goed schudden en kort centrifugeren om vloeistof op te vangen.
3.48	De monsters 2 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.49	De MIDI-plaat op de magnetische standaard plaatsen en gedurende 5 minuten incuberen of tot de oplossing helder is.
3.50	35 µl van het helder geworden supernatant verwijderen en aan een nieuwe 96-well-plaat van 0,2 ml of nieuwe buisjes toevoegen.
Stoppunt: Indien u niet verdergaat met de volgende stap, de plaat afsluiten en bewaren tussen –15 °C en –25 °C.	

De Captured Libraries amplificeren om indexlabels toe te voegen		
3.51	Agendia NGS PCR Master Mix, Agendia NGS Post-Capture PCR Primer, en Agendia NGS 8bp Index Plate ontdooien en deze in ijs plaatsen. Opmerking: Agendia NGS PCR Master Mix is viskeus; gedurende 30 seconden schudden alvorens PCR primers toe te voegen. Post-Capture PCR Mix voorbereiden volgens onderstaande tabel , in een buisje van 1,5 ml in ijs.	
	Reagentia	Volume per reactie
	Agendia NGS PCR Master Mix	25 µl
	Agendia NGS Post-Capture PCR Primer	1 µl
	Totaal volume	26 µl
	Het mengsel voorzichtig schudden en centrifugeren. Bewaren op ijs.	
3.52	Voor elk te amplificeren monster 26 µl van de Post-Capture PCR Mix in een monsterputje van een PCR-plaat doen.	
3.53	5 µl van de juiste indexing primer (van de Agendia NGS 8bp Index Plate) toevoegen aan elk monsterputje met Post-Capture PCR Mix. Gebruik een verschillende indexing primer voor elk monster dat in dezelfde baan moet worden gesequentieerd.	
3.54	19 µl gezuiverde library uit stap 3.50 toevoegen aan elk monsterputje met Post-Capture PCR Mix . Mengen door 10 maal op en neer te pipetteren. De plaat kort centrifugeren.	
3.55	De PCR-plaat in een thermocycler plaatsen. Het volgende thermocyclerprogramma uitvoeren: Verwarmd deksel op 105 °C 1. 2 minuten op 95 °C 2. 30 seconden op 95 °C	

- | | |
|--|---|
| | <ol style="list-style-type: none">3. 30 seconden op 57 °C4. 1 minuut op 72 °C5. Stap 2-4 herhalen voor in totaal 12 cycli.6. 5 minuten op 72 °C7. Op 4 °C houden. |
|--|---|

De geamplificeerde Captured Libraries zuiveren met AMPure XP Beads.	
3.56	AMPure XP Beads gedurende ten minste 30 minuten op kamertemperatuur laten komen. De beadsuspensie schudden tot deze homogeen is.
3.57	90 µl homogene beadsuspensie toevoegen aan elk monsterputje van een nieuwe 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
3.58	50 µl montermix overbrengen in de respectieve monsterputjes van de 96-well MIDI-plaat van 0,8 ml.
3.59	De plaat afsluiten, schudden en kort centrifugeren.
3.60	De monsters 5 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.61	De plaat gedurende ten minste 5 minuten op een magnetische standaard op kamertemperatuur plaatsen.
3.62	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat, voorzichtig de helder geworden oplossing uit elk monsterputje verwijderen en weggooien. De beads niet aanraken bij het verwijderen van de oplossing.
3.63	Terwijl de plaat op de magnetische standaard staat 200 µl verse 70% ethanol in elk monsterputje gieten.
3.64	10 seconden wachten (of tot de oplossing helder is) om eventuele verstoorde beads te laten bezinken en dan voorzichtig de ethanol verwijderen.
3.65	Dit herhalen voor in totaal 2 wasbeurten.
3.66	Indien nodig kort de MIDI-plaat centrifugeren, de plaat terugplaatsen op de magnetische standaard en de resterende ethanol druppels met een pipet verwijderen.
3.67	De monsters gedurende 3 minuten drogen op het warmteblok, op 37 °C. Niet te lang laten drogen, maar ervoor zorgen dat alle ethanol verwijderd is.
3.68	22,5 µl Buffer EB toevoegen aan elk monsterputje.
3.69	De plaat afsluiten, goed schudden en kort centrifugeren om vloeistof op te vangen.
3.70	De monsters 2 minuten incuberen op kamertemperatuur.
3.71	De MIDI-plaat op de magnetische standaard plaatsen en gedurende 5 minuten incuberen of tot de oplossing helder is.
3.72	21 µl van het helder geworden supernatant overbrengen naar een nieuwe 96-well-plaat of naar nieuwe buisjes.
Stoppunt: Indien u niet verdergaat met de volgende stap, de plaat afsluiten en 21 µl geïndexeerde libraries bewaren tussen -15 °C en -25 °C.	

QC 3: Kwaliteitsbeoordeling van geamplificeerde, doelverrijkte geïndexeerde libraries

De grootteverdeling van elke geamplificeerde, gevangen, geïndexeerde library bevestigen met behulp van een geschikt analyseplatform voor nucleïnezuurfragmenten. De fragmentgrootteverdeling moet 150-700 bp zijn. Om een nauwkeurige kwantificering te krijgen, ervoor zorgen dat de concentratie binnen het lineaire bereik van de test valt (5-500 pg/µl).

Molariteit van de stockoplossing [pmol/l]	Streefwaarde molariteit [nM]
≥ 4000	4
2000-3999	2

1000-1999	1
<1000	Niet uitvoeren, mislukt monster

Stap 4: Agendia NGS MiSeq Loading

Voorbereiding van het monster

Het MiSeq-monster voorbereiden in CSV-formaat (door komma's gescheiden waarden) volgens de onderstaande instructies.
Dit is een 150 bp single-end protocol.
Raadpleeg de handleiding van Illumina op:
https://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html voor algemene instructies.
Een voorbeeld van een MiSeq-monster is te vinden op: <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>
Onder **[Koptekst]**

Naam onderzoeker:	Verplicht, <i>geleverd door gebruiker</i>
Projectnaam	Verplicht, <i>geleverd door gebruiker</i>
Experimentnaam	Verplicht, <i>geleverd door gebruiker</i>
Datum	Verplicht
Workflow	Verplicht [GenerateFASTQ]
Test	Verplicht [SureSelect]
Chemie	Verplicht [Default]

Onder **[Afgelezen waarden]**: 150

Onder **[Instellingen]**

OnlyGenerateFASTQ	1
FilterPCRDuplicates	0

Onder **[Data]**

Monster-ID	Monsternaam	Monsterplaat	Monsterputje	Monsterproject	Index	I7_Index_ID
Verplicht, <i>geleverd door gebruiker</i>	Optioneel	Optioneel	Optioneel	Optioneel	Verplicht [Index Sequence]	Optioneel

Opmerking: Elk monster moet een unieke 'monster-ID' hebben; de 'monsternaam' wordt vermeld in de FASTQ-bestandsnamen

Vel opslaan. De software zal de gebruiker vragen het monster te uploaden.

4.2 Het reagenspatroon voorbereiden volgens de aanbevelingen van Illumina.

Uiteindelijke libraries poolen voor multiplex-sequencing

4.3 Het gebruikte sequencing-protocol (**1 nM, 2 nM of 4 nM**) hangt af van de monsters op het voorbereide monster. Elk monster afzonderlijk verdunnen tot de molariteitsstreefwaarde (d.w.z. 1 nM, 2 nM, of 4 nM). Als monsters van verschillende molariteitsstreefwaarden moeten worden gecombineerd in één MiSeq-run, dan alle monsters verdunnen tot de laagste gemeenschappelijke molariteitsstreefwaarde en vervolgens poolen.

4.4 **5 µl** van elk monster toevoegen in één 1,5 ml buis.

4.5 Schudden, kort centrifugeren en in ijs plaatsen.

Gepoolde cDNA-library denatureren				
4.6	Een vers buisje met 0,2 N NaOH voorbereiden (0,2 N NaOH is maximaal 12 uur stabiel) De gepoolde library uit stap 4.5 denatureren volgens het gebruikte sequencing-protocol:			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Gepoolde library	10 µL	5 µL	5 µL
	0,2 N NaOH	10 µL	5 µL	5 µL
4.7	Kort schudden om te mengen en gedurende 1 minuut centrifugeren bij 280 × g op kamertemperatuur.			
4.8	Gedurende 5 minuten incuberen op kamertemperatuur.			
Gedenatureerde cDNA-library verdunnen				
4.9	De gedenatureerde cDNA-library uit stap 4.8 verdunnen met voorgekoelde HT1-buffer volgens het gebruikte sequencing-protocol: Opmerking: De HT1-buffer omkeren om te mengen.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Gedenatureerde cDNA-library	20 µL	10 µL	10 µL
	HT1	480 µL	490 µL	990 µL
	Concentratie	20 pM	20 pM	20 pM
4.10	Enkele malen omkeren om te mengen, kort centrifugeren en op ijs plaatsen.			
4.11	In een nieuw buisje van 1,5 ml de verdunde gedenatureerde library van stap 4.10 verder verdunnen volgens het sequencing-protocol om de gewenste uiteindelijke inputconcentratie te verkrijgen.			
		1 nM	2 nM	4 nM
	Gedenatureerd DNA	500 µL	500 µL	450 µL
	HT1	167 µL	167 µL	150 µL
	Eindconcentratie	15 pM	15 pM	15 pM
4.12	Enkele malen omkeren om te mengen en dan pulscentrifugeren. In ijs plaatsen tot u klaar bent om in het MiSeq-reagenspatroon te laden.			
De monsterlibrary en PhiX-controle combineren (optioneel)				
4.13	20 pM PhiX voorbereiden volgens het MiSeq-protocol van Illumina of de 20 pM PhiX-library (indien eerder voorbereid) op ijs laten ontdooien. Omkeren om te mengen en kort centrifugeren.			
4.14	De volgende volumes van de PhiX-controle- en monsterlibrary uit stap 4.12 combineren in een buisje van 1,5 ml: a. 6 µl gedenatureerde, verdunde 20 pM PhiX-library b. 594 µl gedenatureerde, verdunde monsterlibrary (als geen PhiX is toegevoegd, dan 600 µl gedenatureerde, verdunde monsterlibrary toevoegen)			
4.15	Enkele malen omkeren om te mengen en dan pulscentrifugeren. Opzij zetten in ijs plaatsen tot u klaar bent om in het MiSeq-reagenspatroon te laden.			
Sequencing op de MiSeq				
4.16	Selecteer 'Sequence' in het 'Welkom'-scherm van de software-interface om de instelstappen voor de sequencing-run te starten.			
4.17	Als u Windows 7 gebruikt: a. Selecteer de opdracht 'Change Sample Sheet' (monstervel wijzigen) in het scherm Load Reagents (reagentia laden) om de software naar het juiste monstervel te leiden. b. Selecteer 'Browse' (bladeren) om naar het monstervel te gaan en selecteer 'Open' (openen).			

	c. Selecteer 'Save and Continue' (opslaan en doorgaan) en selecteer 'Next' (volgende) om de runparameters te bekijken. d. Ga verder met het laden van de MiSeq.
4.18	Als u Windows 10 gebruikt: a. Selecteer bij Run Setup (setup uitvoeren) de optie 'Sample Sheet' (monstervel). b. [Optioneel] BaseSpace inschakelen, selecteer 'Use BaseSpace™ Sequence Hub for this run' (BaseSpace™ uitvoeren voor deze run) en meld u aan voor gebruik. c. Selecteer anders 'Next' (volgende) en blader om uw monstervelbestand (.csv) te selecteren. Het bestand wordt naar de Local Run Manager verzonden voor validatie of het maken van een run. d. [Optioneel] Selecteer 'Disable Local Run Manager Secondary Analysis' (secundaire analyse van lokale runmanager uitschakelen) om de secundaire analyse van de lokale runmanager te omzeilen. e. Herstel indien nodig fouten in het monstervel. f. Selecteer 'Next' (volgende) en ga verder met het laden van de Flow Cell.
4.19	Nu de sequencing uitvoeren volgens het Illumina MiSeq Sequencing-protocol om FASTQ-bestanden te genereren. Raadpleeg de systeemhandleiding van Illumina voor meer informatie over het MiSeq-systeem: https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html

Stap 5: Analyse van FASTQ-bestanden via ADAPT

De FASTQ-bestanden die door de MiSeq-sequencer worden gegenereerd, worden verwerkt door de Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT), een krachtig en veiligheidscompatibel cloud-gebaseerd genoom-analyseplatform. ADAPT is bestemd voor gebruik in combinatie met de MammaPrint® Blueprint® Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker (MammaPrint Blueprint Kit). ADAPT biedt geïntegreerde analyse en rapportage van de uitslagen van monsters die met de MammaPrint Blueprint NGS Kit zijn verwerkt.

De ADAPT-CE-gebruikershandleiding (EM-002) bevat stapsgewijze instructies voor het aanmaken van een account, het installeren van een beveiligde bestandsconnector, het uploaden en analyseren van geanonimiseerde patiëntgegevens in een beveiligde omgeving, en het ophalen van testresultaten.

ADAPT is een beveiligd cloud-based systeem en is toegankelijk via de onderstaande browsers.

Browser	Ondersteunde versie	Besturingssysteem
Google, Chrome & Mozilla Firefox	Meest recente stabiele versie van	Windows, Mac en Linux

Lees alle instructies in de ADAPT-CE-gebruikershandleiding (EM-002) door voordat u begint. Als u na het lezen van deze instructies nog vragen heeft, neem dan contact op met de Agendia Product Support (NGS.support@agendia.com) voor assistentie.

Resultaten

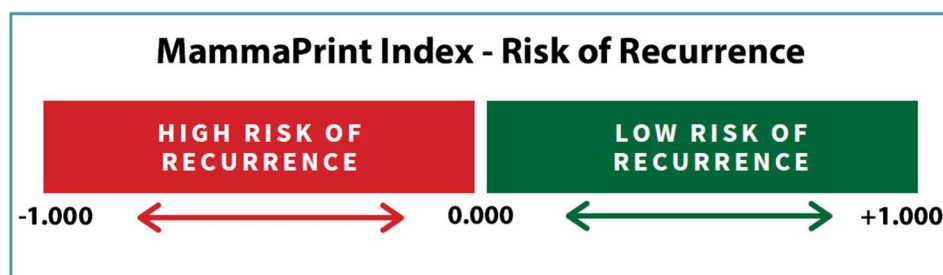
De gebruiker ontvangt twee documenten per monster – het technisch rapport (Technical Report) en de toelichting op de resultaten (Explanation of Results). Het technische rapport (Technical Report) bevat informatie over het monster en de ADAPT-verwerking, met inbegrip van informatie over kwaliteitscontrole en de resultaten van de MammaPrint Blueprint NGS Kit, waaronder de MammaPrint Index (MPI), de bepaling van het risico op terugkeer (Hoog Risico of Laag Risico), en het resultaat van Blueprint (luminaal type, HER2-type of basaal type). Raadpleeg het gedeelte Interpretatie van de resultaten (Explanation of Results) voor meer gedetailleerde informatie. In de Toelichting op de resultaten (Explanation of Results) worden de testresultaten uitgelegd in de context van gepubliceerde klinische gegevens.

Interpretatie van resultaten

Een testresultaat wordt alleen als geldig beschouwd als in het veld 'Algemene beoordeling' (Overall Assessment) van het technische rapport (Technical Report) 'Pass' (goedgekeurd) staat. Als een van de kwaliteitscontrolemaatstaven faalt, zal de algemene beoordeling ook 'Fail' (afgekeurd) aangeven. Als de algemene beoordeling 'Fail' luidt, staat er in het gedeelte 'Testresultaten' (Technical Results section) van het technische rapport 'Voor dit specimen kan geen resultaat worden gegeven' (Unable to provide result for this specimen) en wordt het document 'Toelichting op de resultaten' (Explanation of Results) niet verstrekt. Het testlaboratorium kan ervoor kiezen het monster opnieuw te testen om te zien of het daaropvolgende resultaat wel een geldig testresultaat oplevert.

MammaPrint

De uitslag van de MammaPrint wordt binair weergegeven en kan 'Laag Risico' (Low Risk) of 'Hoog Risico' (High Risk) zijn wat betreft het risico op recidief. Het prognostische profiel (Laag Risico, Hoog Risico) van het monster wordt bepaald door de MPI te berekenen op een schaal van -1,000 tot +1,000 (MammaPrint FFPE uitslagenbereik, afbeelding 2). Hoog Risico-resultaten hebben een MammaPrint Index (MPI) die lager dan of gelijk is aan 0.000, terwijl Laag Risico-resultaten een MPI hoger dan 0.000 hebben. Als de MPI binnen een vooraf bepaald gebied rond de classificatie cut-off tussen -0,058 en +0,058 valt, is de classificatienauwkeurigheid minder dan 90%.



Afbeelding 2. MammaPrint-index

BluePrint

BluePrint is een moleculaire subtyperingstest die borstkanker in drie verschillende subtypen indeelt: Luminaal-type, HER2-type, en Basaal-type door de mRNA-niveaus van 80 genen te bepalen die het beste onderscheid maken tussen deze 3 verschillende moleculaire subtypes. Elk van deze subtypen vertoont duidelijke verschillen in het resultaat op lange termijn en de respons op (neo)-adjuvante chemotherapie [10]. Door MammaPrint en BluePrint te combineren, kunnen patiënten in de volgende subgroepen worden gestratificeerd: Luminaal-type/MammaPrint Laag Risico (vergelijkbaar met Luminaal A); Luminaal-type/MammaPrint Hoog Risico (vergelijkbaar met Luminaal B); HER2-type en Basaal-type.

Beperkingen van de procedure

- MammaPrint BluePrint Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker is alleen gevalideerd voor gebruik met FFPE-tumorweefsel van borstkanker van vrouwelijke patiënten. Het testen van andere soorten monsters of andere conserveringsmethoden is niet beoordeeld.
- De RNeasy FFPE kit is gevalideerd voor gebruik in deze test. Het gebruik van andere RNA-isolatiesets is niet beoordeeld.
- De MammaPrint BluePrint NGS Kit is gevalideerd in combinatie met Illumina MiSeq V3-reagentia gedurende 150 cycli. Het gebruik van andere DNA-sequencers of andere reagentia is niet beoordeeld.
- Een MammaPrint Laag Risico-uitslag garandeert niet dat de borstkanker niet binnen vijf jaar zal terugkeren. Evenzo garandeert een Hoog Risico-uitslag niet dat de borstkanker zal terugkeren.
- De uitslagen van MammaPrint BluePrint NGS zijn geïndiceerd voor gebruik door artsen en moeten samen met andere standaard klinisch-pathologische factoren worden geïnterpreteerd. De test is niet bedoeld om de uitkomst van een ziekte te bepalen.

Verwachte waarden

MammaPrint

Klinische gegevens uit bevolkingsonderzoeken hebben de klinische bruikbaarheid van de MammaPrint test in de beoogde gebruikspopulatie aangetoond. MammaPrint is klinisch gevalideerd in prospectieve klinische onderzoeken voor gebruik bij patiënten met borstkanker in een vroeg stadium (I, II en III), ongeacht hun status wat betreft oestrogeenreceptor (ER) of HER2, met een tumorgrootte $\leq 5,0$ cm en 0-3 positieve lymfeklieren (LN 0-3), zonder speciale specificaties voor nodale micrometastasen. In de MINDACT-studie toonde de primaire analyse aan dat het afzien van chemotherapie bij patiënten met een klinisch hoog risico/genomisch-MammaPrint Laag Risico (C-hoog/G-laag) geen nadelige invloed heeft op het resultaat. Er werd geen significant voordeel van adjuvante systemische chemotherapie na 5 jaar waargenomen bij MammaPrint Laag Risico-patiënten met 1-3 positieve lymfeklieren [11]. Op grond van deze en andere gepubliceerde onderzoeken [8] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] is aangetoond dat de MammaPrint test de klinische uitkomsten bij vrouwen met borstkanker in een vroeg stadium beter voorspelt.

BluePrint

Borstkanker van het Basale type wordt gekenmerkt door genexpressie van de basale/myo-epitheliale oorsprongscellen. Kankers van het Basale type zijn meestal triple-negatief voor ER, PR en HER2 (basaal-achtig) en hebben een specifiek genexpressieprofiel. Hormoontherapie en anti-HER2 therapieën, zoals trastuzumab en lapatinib, worden niet verondersteld doeltreffend te zijn tegen deze kankers, hoewel aangenomen wordt dat chemotherapie nuttig kan zijn.

Borstkanker van het Luminale type wordt gekenmerkt door genexpressie van de luminale epitheelcellen die de borstkanalen en -klieren bekleden. Kankers van het Luminale type zijn meestal hormoonreceptor-positieve tumoren en zullen waarschijnlijk reageren op hormoontherapie. Patiënten met de classificatie MammaPrint Laag Risico en Luminaal-type zullen naar verwachting een vergelijkbaar klinisch beloop als Luminaal A-patiënten, die gewoonlijk met hormoontherapie worden behandeld, terwijl patiënten met de uitkomst MammaPrint Hoog Risico en Luminaal-type naar verwachting een vergelijkbaar klinisch beloop zullen hebben als Luminaal B-patiënten, die gewoonlijk baat hebben bij een agressievere behandeling die chemotherapie kan omvatten.

Borstkankers van het HER2-type worden gekenmerkt door amplificatie of overexpressie van de HER2-locus en zijn meestal HER2-positieve tumoren via IHC of FISH (HER2/neu-positief). Deze kankers hebben de neiging sneller te groeien en kunnen terugkeren, hoewel ze vaak kunnen worden behandeld met anti-HER2-therapieën.

Prestatiekenmerken

Om de precisie, reproduceerbaarheid en interlaboratorium-reproduceerbaarheid van de MammaPrint Blueprint Kit voor moleculaire subtypering en het bepalen van het recidiefrisico van borstkanker in te schatten, zijn analytische en klinische validatiestudies uitgevoerd, waarvan de resultaten hieronder worden weergegeven.

MammaPrint

Analytische prestaties

De concordantie tussen de MammaPrint test op basis van NGS en de nu op de markt gebrachte MammaPrint FFPE op basis van microarray technologie werd beoordeeld aan de hand van RNA van 85 FFPE-monsters. Alle tests werden uitgevoerd in het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland. De testprestaties werden bepaald door de positieve procentuele overeenkomst (PPA), de negatieve procentuele overeenkomst (NPA) en de algemene concordantie tussen de twee tests te berekenen. De PPA, NPA en algemene concordantie bedroegen respectievelijk 100%, 94% en 98%.

De reproduceerbaarheid van de MammaPrint test op basis van NGS werd in de loop van de tijd beoordeeld met behulp van RNA geïsoleerd uit drie FFPE-weefselmonsters die beide MammaPrint risicocategorieën vertegenwoordigden (MammaPrint Hoog Risico en Laag Risico). De monsters werden meerdere malen op verschillende dagen geanalyseerd door meerdere medewerkers in Agendia's laboratoria in Amsterdam, Nederland en Irvine, Californië, VS. Per dag werd één run uitgevoerd: Monster 1 had 25 metingen, monster 2 had 17 metingen en monster 3 had 14 metingen. De mediane relatieve reproduceerbaarheid op basis van de MammaPrint-index was 98%.

De reproduceerbaarheid werd beoordeeld aan de hand van twee isolaties van RNA verkregen uit hetzelfde FFPE-weefselmonster, voor een totaal van 43 monsters. De twee isolaties van de 43 weefselmonsters werden op dezelfde dag geanalyseerd in het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland. De overeenstemming van de MammaPrint-resultaten tussen de eerste en tweede isolatie met deze 43 monsters bedroeg 98%.

De interlaboratorium-reproduceerbaarheid werd beoordeeld op twee externe Europese locaties en in het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland. In totaal werd RNA geïsoleerd uit 16 FFPE-monsters voor onderzoek naar de drie locaties verzonden. De 16 monsters werden verdeeld over ten minste twee medewerkers op elke locatie. De interlaboratorium-reproduceerbaarheid werd bepaald tussen de twee externe locaties en Agendia. De algemene concordantie was 100%.

Verschillende stoffen werden beoordeeld om mogelijke interferentie met de testresultaten van de MammaPrint en Blueprint NGS Kit vast te stellen (bijv. gDNA, Prot. K, Actinomycine D, ethanol en natriumhydroxide). Geen van de geteste stoffen had effect op de MammaPrint- en Blueprint-testresultaten.

De aantoonbaarheidsgrens (Limit of Detection, LoD) werd bepaald op het post-capture materiaal, waarbij de verschillende molariteitsniveaus werden beoordeeld op de MiSeq, wat resulteerde in een LoD van 0,4 nM. De drempelwaarde van de molariteit van het gevangen materiaal is 1,0 nM, wat ruim boven de LoD ligt.

Klinische prestaties

De MammaPrint test op basis van NGS klinische prestatiekenmerken werd beoordeeld aan de hand van een onderzoekscohort van 316 FFPE-weefselmonsters van borsttumoren die retrospectief werden verzameld en gearhiveerd van borstkankerpatiënten met de ziekte in stadium I of stadium II, tumorgrootte < 5,0 cm en lymfekliernegatief of 1-3 lymfeklierpositief, ingeschreven tussen 2004 en 2006. Om de klinische prestaties van de MammaPrint test te ondersteunen, werden de 316 monsters geëvalueerd met 5-jaar uitkomstgegevens voor Distant Recurrence Free Interval (DRFI, ziektevrij interval), d.w.z. de tijd tot de diagnose van afstandsmetastase of overlijden ten gevolge van borstkanker. Zoals verwacht toonden deze gegevens een significant verschil aan tussen de MammaPrint Hoog Risico- en Laag Risico-groepen voor het 5-jaars ziektevrije interval (LogRank $p=0,002$). Belangrijk is dat de klinische prestaties van de MammaPrint-test op basis van NGS voor zowel Hoog Risico- als Laag Risico-groepen in dit onderzoekscohort statistisch gelijkwaardig waren (Hoog Risico $p=0,83$, Laag Risico $p=0,44$) aan de prestaties van de nu op de markt gebrachte MammaPrint FFPE op basis van microarraytechnologie.

Tenslotte werd een veldcorrelatiestudie uitgevoerd op twee onafhankelijke Europese veldlocaties. Borstkankermonsters werden prospectief verzameld bij 95 patiënten in de beoogde gebruikspopulatie (d.w.z. ziekte in stadium I of stadium II, tumorgrootte < 5,0 cm en lymfekliernegatief of 1-3 lymfeklierpositief). Deze monsters werden op de veldlocaties verwerkt met de MammaPrint test op basis van NGS en een deel van het weefsel werd verzonden naar het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland, voor het testen met de MammaPrint test op basis van NGS, evenals met de nu op de markt gebrachte MammaPrint FFPE op basis van microarray technologie. De testresultaten werden beoordeeld door de NGS resultaten van de MammaPrint test, verkregen op de veldlocaties, te vergelijken met de NGS resultaten van de MammaPrint test en met de FFPE resultaten van de MammaPrint test, verkregen bij Agendia. De concordantie tussen de MammaPrint test op basis van NGS, uitgevoerd in het veld, en de MammaPrint test op basis van NGS, uitgevoerd bij Agendia, op basis van 86 monsters, bedroeg 93%. Evenzo was de concordantie tussen MammaPrint test op basis van NGS, uitgevoerd in het veld, en MammaPrint FFPE op basis van microarray technologie, uitgevoerd bij Agendia, 91%.

Blueprint

Analytische prestaties

De concordantie tussen de Blueprint test op basis van NGS en de nu op de markt gebrachte Blueprint FFPE op basis van microarraytechnologie werd beoordeeld aan de hand van 98 FFPE RNA-monsters. Alle tests werden uitgevoerd in het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland. De testprestaties werden bepaald door de algemene concordantie tussen de twee tests te berekenen, die 100% bedroeg. Er werd een aanvullende vergelijking uitgevoerd tussen Blueprint-resultaten verkregen van de NGS- en microarray-platforms met behulp van 316 monsters. Op basis van deze vergelijking was de algemene

overeenkomst 98%, de overeenkomst voor lumaal-, HER2- en basaal-subtype afzonderlijk bedroeg respectievelijk 100%, 75% en 96%.

De reproduceerbaarheid van de BluePrint-test op basis van NGS werd in de loop van de tijd beoordeeld met behulp van RNA geïsoleerd uit drie FFPE weefselmonsters die de verschillende uitkomstniveaus van BluePrint vertegenwoordigden: Luminaal-type, HER2-type en Basaal-type. De monsters werden meerdere malen op verschillende dagen geanalyseerd door meerdere medewerkers in Agendia's laboratoria in Amsterdam, Nederland en Irvine, Californië, VS. Per dag werd één run uitgevoerd: Monster 1 had 25 metingen, monster 2 had 17 metingen en monster 3 had 14 metingen. De mediane relatieve reproduceerbaarheid in de BluePrint-index voor het lumaal type was 98%, voor het HER2-type 98% en voor het basaal type 98%.

De reproduceerbaarheid werd beoordeeld aan de hand van twee isolaties van RNA uit hetzelfde FFPE-weefsel, voor in totaal 43 monsters. De twee isolaties van de 43 weefselmonsters werden op dezelfde dag geanalyseerd met de BluePrint test op basis van NGS. De concordantie tussen de eerste en tweede isolatie van deze 43 monsters was 100%.

De interlaboratorium-reproduceerbaarheid werd beoordeeld op twee externe Europese locaties en in het laboratorium van Agendia in Amsterdam, Nederland. RNA geïsoleerd uit 16 FFPE-monsters werd voor onderzoek naar de drie locaties gestuurd. De 16 monsters werden verdeeld over ten minste twee medewerkers op elke locatie. De interlaboratorium-reproduceerbaarheid werd bepaald tussen de twee externe locaties en Agendia. De algemene concordantie was 100%.

Klinische prestaties

Er is een veldcorrelatiestudie uitgevoerd op twee onafhankelijke Europese veldlocaties. Borstkankermonsters werden prospectief verzameld bij 95 patiënten in de beoogde gebruikspopulatie (d.w.z. ziekte in stadium I of stadium II, tumorgrootte < 5,0 cm en lymfekliernegatief of 1-3 lymfeklierpositief). Deze monsters werden op de veldlocaties verwerkt met BluePrint test op basis van NGS en een deel van het weefsel werd verzonden naar Agendia's laboratorium in Amsterdam, Nederland, voor het testen van de BluePrint test op basis van NGS, alsmede van de nu op de markt gebrachte BluePrint FFPE op basis van microarraytechnologie. De testresultaten/prestaties van de test werden beoordeeld door de resultaten van de BluePrint test op basis van NGS, verkregen op de veldlocaties, te vergelijken met de resultaten van BluePrint test op basis van NGS en die van de BluePrint FFPE, verkregen bij Agendia. De concordantie tussen de BluePrint test op basis van NGS, uitgevoerd in het veld, en de BluePrint-test op basis van NGS, uitgevoerd bij Agendia, met 86 monsters, bedroeg 100%. Ook de concordantie tussen de BluePrint-test op basis van NGS, uitgevoerd in het veld, en de BluePrint FFPE op basis van microarraytechnologie, uitgevoerd bij Agendia, bedroeg 98%.

Assistentie

Als u vragen heeft over het gebruik van dit product, neem dan contact op met de Agendia NGS Support NGS.support@agendia.com of per telefoon op +31 (0) 20 462 1510, maandag tot vrijdag van 08:30 tot 17:00 (GMT/UTC +1).

Naam en vestiging van de onderneming



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



Basic UDI-DI: 085002484193128042

Datum van uitgifte

Februari 2025 versie 7

Wijzigingen t.o.v. eerdere versie

Sectie 'Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen' opsommingsteken 3, verwijderd 'als prognostische marker' – MKT-339v7

Uitbreiding van beoogd gebruik MP en BP- MKT-339 v6

Aanvullende informatie BP toegevoegd, updates in de rubrieken beoogd gebruik, waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen, beperkingen van de procedure, de UDI – MKT-339 v5 toegevoegd

Fix-stap 2.37 – MKT-339 v4

Windows 10 aanvulling – MKT-339 v3

Update van de website – MKT-339 v2

Eerste uitgave – MKT-339-v1

Adviserende kennisgeving:

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



© 2021 Agendia. Alle rechten voorbehouden.

Agendia®, MammaPrint®, en BluePrint® zijn handelsmerken van Agendia NV en/of haar gelieerde onderneming in de VS. Alle andere namen en andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectievelijke eigenaars.

De instructies in dit document moeten strikt worden opgevolgd door gekwalificeerd en adequaat opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van het hierin beschreven product te waarborgen. HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN, INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN. AGENDIA AANVAARDT GEEN ENKELE AANSPRAKELIJKHEID DIE VOORTVLOEIT UIT HET ONEIGENLIJK GEBRUIK VAN HET/DE HIERIN BESCHREVEN PRODUCT(EN) (INCLUSIEF ONDERDELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

Symbolen

Raadpleeg de volgende symbolenlijst voor een volledige toelichting op de symbolen die op de verpakking en het etiket van het product kunnen voorkomen.

Symbol	Naam van het symbool	Beschrijving van het symbool
	Fabrikant	De fabrikant van het medische hulpmiddel, zoals gedefinieerd in Verordening (EU) 2017/746
	Houdbaarheidsdatum	De datum waarna het medische hulpmiddel niet meer mag worden gebruikt.
	Batchcode	De batchcode van de fabrikant, waarmee de batch of partij kan worden geïdentificeerd.
	Artikelnummer	Het catalogusnummer van de fabrikant, waarmee het medische hulpmiddel kan worden geïdentificeerd.
	Beschermen tegen direct zonlicht	Geeft aan dat een medisch hulpmiddel bescherming tegen lichtbronnen nodig heeft.
	Temperatuurlimiet	Duidt de temperatuurgrenzen aan waaraan het medische hulpmiddel veilig kan worden blootgesteld.
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Geeft aan dat de gebruiker de gebruiksaanwijzing moet raadplegen.
	Waarschuwing	Geeft aan dat de gebruiker de gebruiksaanwijzing moet raadplegen voor belangrijke voorzorgsinformatie, zoals waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen, die om uiteenlopende redenen niet op het medische hulpmiddel zelf kan worden vermeld.
	Medisch hulpmiddel voor <i>in vitro</i> diagnostiek	Een medisch hulpmiddel dat bestemd is om te worden gebruikt als een medisch hulpmiddel voor <i>in vitro</i> diagnostiek.
	Niet gebruiken indien verpakking beschadigd is	Geeft aan dat een medisch hulpmiddel niet gebruikt mag worden als de verpakking beschadigd is of al geopend was.
	Bevat voldoende voor tests	Geeft het totale aantal IVD-tests aan dat met het IVD kan worden uitgevoerd.
	Draag oogbescherming	Draag oogbescherming
	Draag beschermende handschoenen	Draag beschermende handschoenen

	Draag beschermende kleding	Draag beschermende kleding
	Corrosion	Kan bijtend zijn voor metalen Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel
	Health hazard	Kan dodelijk zijn als de stof bij inslikken in de luchtwegen terechtkomt Veroorzaakt schade aan organen Kan schade aan organen veroorzaken Kan de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden Kan mogelijk de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden Kan kanker veroorzaken Verdacht van het veroorzaken van kanker Kan genetische schade veroorzaken Verdacht van het veroorzaken van genetische schade Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken

Bibliografie

- [1] J. C. Haan, R. Bhaskaran, A. Ellappalaym, Y. Bijl, C. Griffioen, W. Audeh, F. Penault-Llorca, L. Mittempergher and A. Glas, "MammaPrint and Blueprint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients," *Genes Chromosomes Cancer*, pp. 148-160, 2021.
- [2] L. J. van 'Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven and C. Robert, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, pp. 530 - 535, 2002.
- [3] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, D. Hongyue, A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen and A. Glas, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 25, pp. 1999 - 2009, 19 December 2002.
- [4] A. M. Glas, A. Floore, L. J. Delahaye, A. T. witteveen, P. R. C.F., N. L.-D. J. S. Bakx, T. J. Bruinsma, M. O. Warmoes, R. Bernards, L. F. Wessels and L. J. van 't Veer, "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test," *BMC Genomics*, October 2006.
- [5] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J. S. Carroll, S. Tian, F. A. de Snoo, R. A. Bender, R. Bernards and A. M. Glas, "A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 133, no. 1, pp. 37-47, 2012.

- [6] S. Mook, M. K. Schmidt, B. Weigelt, B. Kreike, I. Eekhout, M. J. van de Vijver, A. M. Glas, A. Floore, E. J. T. Rutgers and L. J. van 't Veer, "The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age.," *Annals of Oncology*, vol. 21, no. 4, pp. 717-722, 2009.
- [7] M. Buyse, L. Sherene, v. 'l. V. Laura, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. Saghastchian d'Assignies, B. Jonas, R. Lideau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse and A. Floore, "Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women with Node-Negative Breast Cancer," *Journal of the Nat. Can. Int.*, vol. 98, no. 17, pp. 1183 - 1192, 6 September 2006.
- [8] C. Drukker, J. Bueno-de-Mesquita, V. Retel, W. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. Roumen, M. Knauer, L. van 't Veer, G. Sonke, E. Rutgers, M. van de Vijver and S. Linn, "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study," *International Journal of Cancer*, vol. 133, pp. 929 - 936, January 2013.
- [9] I. Beumer, A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernardis, L. van 't Veer and A. Glas, "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 156, no. 2, pp. 279-287, 2016.
- [10] S. Gluck, F. de Snoo, J. Peeters, L. Stork-Sloots and G. Somlo, "Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, no. 3, pp. 759-767, 2013.
- [11] M. Piccart, L. J. van 't Veer, C. Poncet, J. M. N. Lopes Cardozo, S. Delaloge, J.-Y. Pierga, P. Vuylsteke, E. Brain, S. Vrijaldenhoven, P. A. Neijenhuis, S. Causeret, T. J. Smilde, G. Viale, A. M. Glas, M. Delorenzi, C. Sotiriou, I. T. Rubio, S. Kümmel, G. Zoppoli, A. M. Thompson, E. Matos, K. Zaman, F. Hilbers, D. Fumagalli, P. Ravdin, S. Knox, K. Tryfonidis, A. Peric, B. Meulemans, J. Bogaerts, F. Cardoso and E. J. T. Rutgers, "70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age," *Lancet Oncology*, vol. 22, no. 4, pp. 476-488, 2021.
- [12] K. Yao, R. Goldschmidt, M. Turk, J. Wesseling, L. Stork-Sloots, F. de Snoo and M. Cristofanilli, "Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups," *Breast Cancer Research Treatment*, vol. 154, no. 1, pp. 81-8, 2015.
- [13] L. Esserman, C. Yau, C. K. Thompson, L. J. van 't Veer, A. D. Borowsky, K. A. Hoadley, N. P. Tobin, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, C. C. Benz and L. S. Lindström, "Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades," *JAMA Oncology*, no. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261, 2017.
- [14] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruneri, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. Van't Veer and T. C. , "The 70-gene prognosis-signature

- predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 116, no. 2, pp. 295-302, 2009.
- [15] L. J. van 't Veer, C. Yau, N. Y. Yu, C. C. Benz, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, L. J. Esserman and L. S. Lindström, "Tamoxifen therapy benefit for patients with 70-gene signature high and low risk," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 166, no. 2, pp. 593-601, 2017.
- [16] J. M. Bueno-de-Mesquita, W. H. van Harten, V. P. Retel, L. J. van 't Veer, F. Sam van Dam, K. Karsenberg, K. F. Douma, H. van Tinteren, J. L. Peterse, J. Wesseling, T. S. Wu, D. Atsma, E. J. Rutgers, G. Brink, A. N. Floore, A. M. Glas, R. M. Roumen, F. E. Bellot, C. van Krimpen, S. Rodenhuis, M. J. van de Vijver and S. C. Linn, "Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER)," *Lancet Oncology*, vol. 8, no. 12, pp. 1079-1087, 2007.
- [17] B. S. Wittner, D. C. Sgroi, P. D. Ryan, T. J. Bruinsma, A. M. Glas, A. Male, S. Dahiya, K. Habin, R. Bernards, D. A. Haber, L. J. Van't Veer and S. Ramaswamy, "Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 2988-93, 2008.
- [18] L. J. Delahaye, D. Wehkamp, A. N. Floore, R. Bernards, L. J. van 't Veer and A. M. Glas, "Performance characteristics of the MammaPrint breast cancer diagnostic gene signature," *Personalized Medicine*, vol. 10, no. 8, pp. 801-811, 2013.

Bijlage A: Nucleotide-sequenties van MammaPrint Blueprint NGS 8bp-indices

Tabel 1: Nucleotide-sequenties van MammaPrint Blueprint-set indices A01 tot H04

Index (plaatcoördinaat)	Sequentie
A01	ATGCCTAA
B01	GAATCTGA
C01	AACGTGAT
D01	CACTTCGA
E01	GCCAAGAC
F01	GACTAGTA

G01	ATTGGCTC
H01	GATGAATC
A02	AGCAGGAA
B02	GAGCTGAA
C02	AAACATCG
D02	GAGTTAGC
E02	CGAACTTA
F02	GATAGACA
G02	AAGGACAC
H02	GACAGTGC
A03	ATCATTCC
B03	GCCACATA
C03	ACCACTGT
D03	CTGGCATA
E03	ACCTCCAA
F03	GCGAGTAA
G03	ACTATGCA
H03	CGGATTGC
A04	AACTCACC
B04	GCTAACGA
C04	CAGATCTG
D04	ATCCTGTA
E04	CTGTAGCC
F04	GCTCGGTA
G04	ACACGACC
H04	AGTCACTA