

Informacinis lapelis Prosigna[®] krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimas



10 versija, sukurta 2019 m. 9 mėn.



1–10 testų

Laikymo sąlygos

-20 °C Laikyti -20 °C arba žemesnėje temperatūroje	Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimo kasetės.
-80 °C Laikyti -80 °C arba žemesnėje temperatūroje	Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimo kodų rinkinys
+15 °C Laikyti kambario temperatūroje	Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimo paruošimo pakuotė
+2 °C Laikyti +4 °C temperatūroje	Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimo paruošimo plokštelės

TURINYS

1	NUMATYTAS NAUDOJIMAS / PASKIRTIS	1
2	TESTO SISTEMOS SANTRAUKA	1
2.1	nCounter Dx analizinės sistemos principai	2
2.2	Prosigna algoritmo, skirto išvesties skaičiavimui, principai	2
3	TEIKIAMŲ REAGENTŲ IR ĮRANGA	2
3.1	Prosigna rinkinio apžvalga	2
3.2	Prosigna rinkinio turinys, kuris skirtas 1, 2, 3, 4 arba 10 testų Prosigna rinkiniams	3
4	ISPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS	3
5	BENDROSIOS TYRIMO PASTABOS	3
5.1	Audinio apdorojimas	3
5.2	Prosigna tyrimo eiga	4
6	MOKYMŲ INFORMACIJA	4
7	ATLIEKŲ TVARKYMAS	4
8	LAIKYMAS IR TVARKYMAS (REAGENTŲ)	4
9	PROSIGNA REIKALINGI PRIETAISAI	4
10	REIKALINGI, BET NEPAITEIKTI REAGENTAI IR ĮRANGA	4
10.1	Medžiagos	4
10.2	Įranga	4
10.3	Įrangos charakteristikos	4
11	MĖGINIŲ PAĖMIMAS IR APDOROJIMAS	5
11.1	Reikalavimai audinių mėginiams ir patologijų apžvalga	5
11.2	Mėginių paėmimas ir laikymas	5
11.3	Objektinio stiklėlio paruošimas	5
11.4	Objektinio stiklėlio apdorojimas	5
11.5	RNR išskyrimas	6
11.6	RNR koncentracijos ir kokybės matavimas	6
11.7	Tyrimo procedūra	7
12	TRIKIŲ ŠALINIMAS IR TESTO NESĖKMĖS	9
13	TYRIMO REZULTATAI	9
13.1	Vidiniai potipiai	9
13.2	Būklės pasikartojimo rizikos įvertis	10
13.3	Nutolusių būklės pasikartojimų per 10 metų tikimybė	10
13.4	Rizikos klasifikacija	10
13.5	Kokybės kontrolė	10
14	PROCEDŪRŲ APBŪDIMAI	10
15	LAUKIAMOS VERTĖS	11
15.1	Būklės pasikartojimo rizikos intervalas pagal potipį	11
15.2	Būklės pasikartojimo rizikos įverčio dažnis pagal mazgelių būklę	11
15.3	Pacientų išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos kategoriją	11

16	NAŠUMO CHARAKTERISTIKOS	12
16.1	Analizinis tikslumas ir atkuriamumas	12
16.2	Jautrumas / RNR sąnaudos	13
16.3	Interferencijos tyrimas	13
16.4	Klinikinis našumas	14
17	LITERATŪRA	25
18	SIMBOLIAI IR APIBRĖŽIMAI	26
19	KONTAKTINĖ INFORMACIJA	26

1 NUMATYTAS NAUDOJIMAS / PASKIRTIS

Prosigna[®] krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimas yra *in vitro* diagnostinis tyrimas, kuris naudoja ląstelių genų raiškos profilį, aptinkamą krūties vėžio audinyje, tam, kad būtų įvertinta pacientės rizika vėlesniam būklės pasikartojimams. Tyrimo metu matuojamas genų raiškos profilis, naudojant RNR, kuri išskirta iš formalinu užfiksuoto, parafinu imobilizuoto (FFPE) krūties navikinio audinio. Genų raiškos duomenys yra vertinami drauge su klinikiniais kintamaisiais, siekiant gauti potipį (luminalinis A, luminalinis B, HER2 praturtintas arba bazalinio tipo) ir nutolusių būklės pasikartojimų tikimybę nurodantį įvertį. Tyrimas atliekamas naudojant NanoString nCounter[®] Dx analizinę sistemą ir FFPE krūties vėžio audinį, kuriam anksčiau buvo diagnozuota invazinė krūties karcinoma.

Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimas yra skirtas moteriškos lyties krūties vėžio pacientėms, kurioms anksčiau buvo atlikta mastektomija arba krūtį išsauganti terapija drauge su lokaliu gydymu, kuris dera su bet kuria iš šių standartinių priežiūrų:

- Prognostinis indikatorius, skirtas 10 metų be nutolusios būklės pasikartojimo išgyvenusioms, moterims po menopauzės, kurių hormonų receptoriams teigiamas (HR+), limfmazgiams neigiamas I arba II stadijos krūties vėžys buvo gydomas taikant vien tik adjuvantų endokrininę terapiją, kai naudojamas kartu su kitais klinikiniais-patologiniais veiksniais.
- Prognostinis indikatorius, skirtas 10 metų be nutolusios būklės pasikartojimo išgyvenusioms, moterims po menopauzės, kurių hormonų receptoriams teigiamas (HR+), limfmazgiams teigiamas (1–3 teigiami mazgeliai arba 4 ar daugiau teigiamų mazgelių) II arba IIIA stadijos krūties vėžys buvo gydomas taikant vien tik adjuvantų endokrininę terapiją, kai naudojamas kartu su kitais klinikiniais-patologiniais veiksniais.

2 TESTO SISTEMOS SANTRAUKA

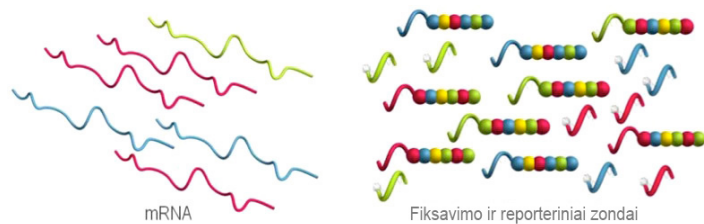
NanoString nCounter Dx analizinė sistema pateikia tiesioginius, daugybinius genų raiškos matavimus, pasitelkdama santykinio mRNR transkriptų gausumo skaitmeninius rodmenis, kai naudojami šie veiksmiai: 1) RNR hibridizacija prie fluorescencinių reporterinių zonų ir fiksavimo zonų; 2) taikinio / zondo kompleksų išgryninimas, naudojant nCounter Prep plokšteles, kurių sudėtyje yra pohibridizaciniam apdorojimui ir imobilizacijai ant nCounter kasetės, esančios nCounter Prep stotelėje, būtini reagentai; 3) nCounter kasetės, esančios nCounter skaitmeniniame analizatoriuje, analizė, siekiant pateikti testo rezultatą. Tiek fiksavimo, tiek reporterinio zondo sudėtyje yra unikalios DNR zonų sekos, kurios skirtos taikinio hibridizacijai ir išgryninimui. Fiksavimo ir reporterinis zondas yra sujungti su teigiamomis ir neigiamomis kontrolėmis ir taip suformuoja kodų rinkinį. Prosigna vienos hibridizacijos reakcijos metu kartu matuoja 50 genų, kurie naudojami vidiniam potipio klasifikavimo algoritmui, raiškos lygius², 8 bendrinių genų, kurie naudojami signalo normalizavimui, raiškos lygius, 6 teigiamas kontroles ir 8 neigiamas kontroles. Šiems matavimams naudojami nukleorūgščių zondai, kurie buvo specifiskai sukurti minėtiems genams. Prosigna rinkinyje taip pat yra palyginamasis mėginys, kuris susideda iš *in vitro* transkribuotų RNR taikinių, skirtų kiekvienam iš 58 genų. Palyginamojo mėginio tyrimas atliekamas su kiekviena pacientės RNR mėginių partija tam, kad būtų apibrėžiamas tyrimas bei normalizuojamas signalas, kuris gaunamas iš kiekvieno geno.

Prosigna tyrimas yra atliekamas su RNR, kuri išskirta iš FFPE krūties navikinio audinio. Patologas nagrinėja hematoksilinu ir eozinu (H ir E) nudažytą objektinį stiklį ir identifikuoja (bei pažymi) invazinės krūties karcinomos sritis, kurios tinkamos tyrimui. Patologas taip pat pamatuoja naviko paviršiaus plotą, kuris apibrėžia testui reikalingą, nedažytą objektinį stiklį skaičių bei naviko ląstelių skaičių tam, kad būtų užtikrintas pakankamas navikinio audinio kiekis, kuris reikalingas tyrimui. Apmokytas technologas atlieka nedažytą objektinį stiklį, kuri atitinka pažymėtą naviko sritį H ir E nudažytame objektiname stiklyje, makrodisekciją ir iš audinio išskiria RNR. Išskirta RNR tuomet yra tirama, naudojant NanoString nCounter Dx analizinę sistemą, siekiant pateikti tyrimo rezultatus, įskaitant vidinį potipį, būklės pasikartojimo rizikos (ROR) įvertį bei rizikos laipsnį.

2.1 nCounter Dx analizinės sistemos principai

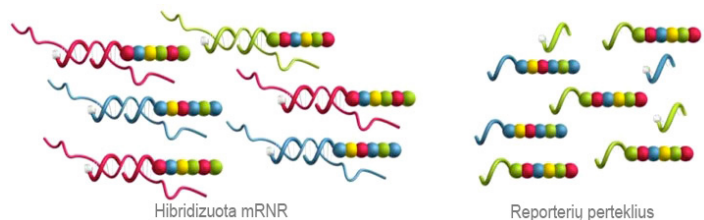
nCounter Dx analizinė sistema naudoja genams specifines zondų poras (1 paveikslas), kurios tiesiogiai hibridizuojasi su mRNR mėginiu, esančiu tirpale, eliminuodamos fermentinės reakcijos, kurios gali įvesti rezultatų paklaidas. Pirmo tyrimo etapo metu DNR zondai tiesiogiai hibridizuojasi su tirpale esančio RNR mėginio 70–100 bazių porų regionu. Fluorescencinis reporterinis zondas susideda iš 35–50 bazių zondo sekos, kuri yra komplementari mRNR taikiniui, bei unikalios DNR „stuburo“ sekos, kuri hibridizuojasi su šešiais RNR segmentais, pažymėtais vienu iš keturių fluorescencinių dažų: raudonu (R), geltonu (G), mėlynu (M) arba žaliu (Ž). Fluorescenciniai segmentai sukuria šešių padėčių / keturių spalvų fluorescencinį „spalvų kodą“, kuris yra unikalus kiekvienam taikiniui. Atskiras fiksavimo zondas susideda iš 35–50 bazių zondo sekos, kuri yra komplementari mRNR taikiniui, ir biotino, kuris yra naudojamas imobilizavimui ant streptavidinu padengtų objektyvinių stiklėlių.

1 paveikslas. Su mRNR hibridizuotas kodų rinkinys.



Po hibridizacijos visi mėginio gryninimo etapai yra automatizuoti nCounter Prep stotelėje. Visų pirma pašalinamas fiksavimo ir reporterinių zondų perteklius (2 paveikslas), iš eilės atliekant sugavimo magnetinėmis dalelėmis veiksmus, lydimus zondo-taikinio kompleksų prijungimo prie atsiktinių nCounter kasetės paviršiaus vietų per streptavidino-biotino jungtį (3 paveikslas). Galiausiai, zondo-taikinio kompleksai yra išrikiuojami ir imobilizuojami (4 paveikslas) nCounter kasetėje.

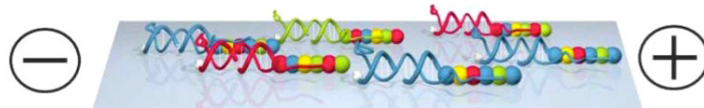
2 paveikslas. Perteklinių reporterių pašalinimas.



3 paveikslas. Hibridizuotų reporterių prisijungimas prie kasetės paviršiaus.



4 paveikslas. Hibridizuotų reporterių išrikiavimas ir imobilizavimas.



Pabaigus mėginio paruošimo procedūrą, kasetė yra įstatoma į nCounter skaitmeninį analizatorių tam, kad būtų surinkti duomenys. Kiekviena dominanti taikinio molekulė yra identifiukuojama, naudojantis „spalvų kodą“, kurį generuoja šešios, tvarkingos fluorescencinės dėmelės, esančios ant su jomis susijungusių reporterinių zondų. Tuomet ant kasetės paviršiaus esantys reporteriniai zondai yra skaičiuojami ir priskiriami kiekvienai taikinio molekulei bei apdorojami, naudojantis algoritmu (5 paveikslas).

5 paveikslas. Duomenų surinkimas.

Kodas	Genas	Skaičius
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Prosigna algoritmo, skirto išvesties skaičiavimui, principai

Testas yra paremtas 50 genų klasifikavimo algoritmu, kuris pradžioje pavadintas PAM50², ir yra atliekamas nCounter Dx analizinėje sistemoje, naudojant RNR, išskirtą iš formalinu užfiksuoto, parafinu imobilizuoto (FFPE) krūties navikinio audinio mėginių. Algoritmui naudojamas 50 genų raiškos profilis, siekiant priskirti krūties vėžį prie vienos iš keturių molekulinė klasių arba vidinių potipių: luminalinio A, luminalinio B, HER2 praturtinto arba bazalinio tipo². Keturių vidinių potipių genų raiškos profilių (pvz., centroidės) prototipas buvo perkvalifikuotas nCounter analizinėje sistemoje, naudojant FFPE krūties navikinius mėginius, kurie surinkti iš kelių klininių vietų Šiaurės Amerikoje. Atlikus pacientės testo mėginio tyrimą, kompiuteriniu algoritmu paremta Pearson koreliacija palygina pacientės testo mėginio normalizuotą 50 genų raiškos profilį su keturių krūties vėžio vidinių potipių raiškos profilių prototipais. Pacientės testo mėginys yra priskiriamas potypiui su didžiausia Pearson koreliacija.

Šis algoritmas toliau pateikia būklės pasikartojimo rizikos (ROR) įvertį skalėje nuo 0 iki 100³, kuris koreliuoja su nutolusių būklės pasikartojimų tikimybe dešimties metų laikotarpiu moterims po menopauzės, kurioms yra hormonų receptoriams teigiamas, ankstyvosios stadijos krūties vėžys⁴. Ataskaitoje taip pat pateikiama rizikos kategorija (žema, vidutinė arba aukšta). ROR įvertis yra apskaičiuojamas, naudojant Cox modelio koeficientus, kurie apima 46 genų pogrupio iš 50 genų Pearson koreliaciją kiekvienai vidinio potipio centroidei, proliferacijos vertę ir bendrą naviko dydį. Testo kintamieji yra padauginami iš atitinkamų Cox modelio koeficientų, norint gauti vertę, kuri tuomet yra perskaičiuojama 0–100 skalėje, remiantis koeficientais, kurie yra sugeneruoti iš FFPE krūties navikų mėginių apmokymo rinkinio. Rizikos kategorijos yra taip pat pateikiamos, remiantis klininio patvirtinimo tyrimo metu nustatytomis ROR ribinėmis vertėmis.

3 TIEKIAMI REAGENTAI IR ĮRANGA

3.1 Prosigna rinkinio apžvalga

Priklausomai nuo užsakymo produkto, Prosigna rinkinį sudaro reagentai, kurių pakanka 1, 2, 3, 4 arba 10 pacientės mėginių apdorojimui. Informacijos apie užsakymą žr. toliau. Prosigna rinkinys susideda iš kodų rinkinio, vieno palyginamojo mėginio mėgintuvėlio, skirto kiekvienam rinkiniui, kurį sudaro nuo vieno iki dešimties testų, ir naudojamų komponentų, kurie prieš išleidžiant yra kartu patikrinami dėl našumo.

Katalogo numeris	Testų skaičius rinkinyje	Pridėtų palyginamųjų mėgintuvėlių skaičius
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Rekomenduojama naudoti drauge su Roche FFPE RNR išskyrimo rinkiniu (Roche-FFPE-025 galima įsigyti tik iš NanoString Technologies).

3.2 Prosigna rinkinio turinys, kuris skirtas 1, 2, 3, 4 arba 10 testų Prosigna rinkiniams

Number of Tests	1	2	3	4	10
Prosigna CodeSet Box					
Prosigna Reporter CodeSet	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL
Prosigna Capture ProbeSet	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL
Prosigna RNA Reference Sample	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL
CodeSet Barcode Sticker	1	1	1	1	1
Test Configuration Code	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Plate Box					
Prep Plates	1	1	1	1	2
Prosigna Cartridge Box					
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Pack Box					
nCounter Prep Station Tips	1	1	1	1	1
nCounter Cartridge Adhesive Cover	2	2	2	2	2
nCounter Tip Sheaths	2	2	2	2	2
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4

Contents Description

Prosigna CodeSet

Prosigna Reporter CodeSet
Prosigna Capture ProbeSet
Prosigna RNA Reference Sample
CodeSet Barcode Sticker
Test Configuration Code

*buffer, nucleic acids with fluorescent dyes
buffer, nucleic acids
buffer, nucleic acids
sticker sheet
card with sticker*

Prosigna Prep Plates

Prep Plates

*superparamagnetic beads, buffer, salts,
oligonucleotides, polystyrene beads containing
fluorescent dyes*

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)

sample cartridge(s)

Prosigna Prep Pack

nCounter Hybridization Buffer
12-Well Notched Strip Tubes
12-Well Notched Strip Tube Lids
nCounter Prep Station Tips
nCounter Cartridge Adhesive Cover
nCounter Tip Sheaths

*buffer, salts
plastic strips
plastic lids
2 racks of 90 tips + 6 piercers nCounter
adhesive films
6-well tip holders*

4 ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Skirta *in Vitro* diagnostiniam naudojimui.
- Numatyta, kad šį tyrimą turi atlikti naudotojai, kurie yra apmokyti taikyti ypač sudėtingus molekulinės biologijos metodus, laikydamiesi vietinių reglamentų.
- Nemaišykite rinkinių komponentų iš skirtingų Prosigna partijų. Funkcionalumas gali būti užtikrintas tik pateiktoms Prosigna rinkinių partijoms, nes jos taip yra paruošiamos gamybos metu.
- Bet kokie likę reagentai neturi būti pakartotinai naudojami Prosigna tyrimo metu.
- Atmeskite visas reakcijas, kurių hibridizacijos laikai arba temperatūros buvo sutrikdytos.
- Svarbu išlaikyti mėginių grandinės laikymo tolygumą (audinių iki RNR ir RNR iki tyrimo) tam, kad būtų užtikrinta, jog pacientės mėginio ID būtų susieta su atitinkamu testo rezultatu.
- Jeigu nebus tenkinamos reagentų laikymo sąlygos, kurios nurodytos ant etiketės, tai gali neigiamai paveikti tyrimo našumą.
- Visuomet mėvėkite pirštines, kai dirbate su reagentais ir mėginiais.
- Venkite užteršimo RNaze, kuri gali neigiamai paveikti rezultatų kokybę.
- Su visais biologiniais mėginiais ir medžiagomis turi būti dirbama taip, tarsi būtų infekcinių agentų perdavimo potencialas. Jos turi būti išmetamos, naudojant tinkamas atsargumo priemones, laikantis federalinių, valstijos ir vietinių reglamentų.
- Niekada nesiurbkite burna naudodami pipetę.

- Venkite reagentų sąlyčio su akimis, oda ir gleivinėmis.
- Naudokite gerąją molekulinės laboratorijos praktiką tam, kad išvengtumėte kryžminio užteršimo tarp testo mėginių arba užteršimo didelės koncentracijos nukleorūgščių taikiniais (sintetiniais arba padaugintais PGR), kurie gali neigiamai paveikti rezultatų kokybę.
- Prosigna Prep plokštelėse ir nCounter kasetėse po apdorojimo yra labai nedideli natrio azido (<0,1 %) kiekiai. Dėl šios priežasties išmetant rekomenduojama naudoti plastikinius (ne metalinius) atliekų rezervuarus. Nors Prosigna atveju labai mažai tikėtina, tačiau yra žinoma, kad natrio azidas kaupiasi ant metalų ir sukelia sprogimo pavojų.
- Papildomą, prietaisui specifinę atliekų tvarkymo informaciją galima rasti nCounter Dx analizinės sistemos naudotojo vadove ir aptarnavimo vadovuose, skirtuose Prep stotelei ir skaitmeniniam analizatoriui.
- Medžiagų saugos duomenų lapo informaciją, skirtą reporteriniams kodų rinkiniui, fiksavimo zonų rinkiniui, hibridizacijos buferiniam tirpalui ir Prep plokštelėms, galima rasti svetainėje www.prosigna.com.
- Visos pavojingos medžiagos turi būti tvarkomos, laikantis jūsų institucijos gairių, skirtų pavojingų atliekų tvarkymui.
- Visi nepanaudoti kodų rinkiniai turi būti išmetami.
- Jeigu pacientės naviko dydžio kategorija yra neteisingai įvesta programinėje įrangoje, ROR įvertis ir rizikos klasifikacija gali būti netinkamai paveikti (pvz., paslinktas ROR įvertis ir (arba) netinkama klasifikacija).
- Jeigu pacientės mazgelių būklė yra neteisingai įvesta programinėje įrangoje, pacientės testo rezultatai gali būti pateikti neteisingai (pvz., klaidinga rizikos klasifikacija).
- Nenaudokite nepakankamos kokybės RNR ar nepakankamo jos kiekio arba naviko pavyzdžių su nepakankamu naviko paviršiaus plotu arba ląstelių kiekiu Prosigna tyrimo metu. Prosigna tyrimas gali neduoti patikimų rezultatų ir pranešti apie tyrimo nesėkmę.

5 BENDROSIOS TYRIMO PASTABOS

- Tyrimą yra numatyta naudoti tik su formalinu užfiksuotų, parafinu imobilizuotų (FFPE) krūties vėžio audinių mėginiais, gautais po chirurginės rezekcijos. Jis nėra skirtas naudoti su šviežiais, užšaldytais arba ne krūties vėžio audiniais.
- Informacija apie bendrą pacientės pirminio naviko dydį ir mazgelių būklę yra reikalinga, norint atlikti tyrimą.
- Naudokite sterilius, vienkartinius mikropipečių antgalius tam, kad apdorojimo metu išvengtumėte reagentų arba mėginių užteršimo mikrobais arba nukleazėmis.
- Išskirtos RNR mėginius laikykite ant šlapio ledo, kai su jais aktyviai nedirbate.
- Kaitinimo blokams reikalingi sukalibruoti termometrai.
- Nenaudokite rinkinio komponentų tuo atveju, jeigu jie buvo pristatyti pažeisti.
- Rekomenduojama, kad būtų sukuriama klinikinės kontrolės (pvz., skirtos rizikos kategorijai) ir kad jos būtų naudojamos laboratorijose, kurios atlieka Prosigna tyrimus, kad būtų užtikrintas rezultatų patikimumas bėgant laikui, kaip standartinių laboratorijų kokybės kontrolės procedūrų dalis.

5.1 Audinio apdorojimas

- Audinio apdorojimo metu makrodisekcijos būdu nepavykus tinkamai pašalinti supančio nenavikinio / normalaus audinio, tai gali lemti nepakankamai įvertintą riziką dėl mažesnio ROR įverčio, kuris pateiktas gydytojui.
- RNR išskyrimo metu nepavykus tinkamai pašalinti žmogaus genominės DNR, tai gali lemti didesnį nesėkmių dažnį dėl mažesnio tyrimo signalo arba pervertintą riziką dėl didesnio ROR įverčio, kuris pateiktas gydytojui.
- Visi nedažytų audinių pjūviai turi būti uždedami ant teigiamai įkrautų mikroskopinių objektinių stiklelių, siekiant išvengti atsikabinimo audinio apdorojimo metu.
- Mėginiams, kuriems reikalingi keli objektiniai stikleliai, visi objektiniai stikleliai turi būti apdorojami vienu metu.
- Ant objekcinio stiklelio uždėti audinių pjūviai gali irti, jeigu jie bus laikomi ilgiau nei 9 mėnesius džiovinančioje aplinkoje.
- Pakeiskite 3 % glicerolio darbinio tirpalo kiekvieną savaitę arba tuomet, jeigu tirpalas pasidaro drumstas, siekdami išvengti užteršimo.
- Pakeiskite pirmą D-limoneno plovimo indo turinį po to, kai buvo apdoroti 4 objekcinių stiklelių rinkiniai, o etanolį (EtOH) ir antrą D-limoneno dažymo indo turinį po to, kai buvo apdoroti 8 objekcinių stiklelių rinkiniai tam, kad būtų išvengta pakenkimo audinio kokybei.
- Būkite atsargūs, kai apibrėšite naviko sritį ant nedažyto objekcinio stiklelio ir kai šalinsite nenavikinį audinį, kad užtikrintumėte, jog navikinis audinys nebūtų pažeistas.
- Atsargiai dirbkite su aštriomis priemonėmis makrodisekcijos metu.

10. Kiekvienam apdorojamam audinio mėginiui naudokite naują skustuvo peiliuką.
11. 10% natrio dodecilsulfatas (NDS) dažnai krinta į nuosėdas, esant kambario temperatūrai, ir turi būti pašildomas 37 °C temperatūroje, kol nuosėdos ištirps.
12. Naujos RNR išskyrimo rinkinių partijos turi būti patikrinamos dėl išskyrimo rinkinių specifikacijų, siekiant įvertinti naujų rinkinių partijų tinkamumą pacienčių tyrimams (išsamesnės informacijos žr. 11.5 skyriuje).

5.2 Prosigna tyrimo eiga

1. Įsitikinkite, kad pacientės kategorinis, pirminis bendras naviko dydis yra teisingai įvestas į programinę įrangą.
2. Įsitikinkite, kad pacientės kategorinė mazgelių būklė yra teisingai įvesta į programinę įrangą.
3. Patikrinkite, ar kaitinimo blokas su kaitinamu dangčiu, kuris reikalingas hibridizacijai, atitinka reikalavimus ir yra periodiškai kalibruojamas.
4. Naudokite tik tas medžiagas, kurios buvo tiekiamos Prosigna rinkinyje. Jos yra specialiai sukurtos taip, kad dirbtų su nCounter Prep stotele ir nCounter skaitmeniniu analizatoriumi.
5. Jeigu hibridizacijos buferinis tirpalas buvo laikomas, esant šaltoms temperatūroms, ir buvo pastebėtos nuosėdos, pašildykite mėgintuvėlius 37 °C temperatūroje tol, kol ištirps druskos.
6. Norėdami sumaišyti tyrimo komponentus, nenaudokite sukurinės maišyklės, nes ji gali pažeisti reagentus. Maišymas turi būti atliekamas naudojant pipetę.
7. Necentrifuguokite reporterinio kodų rinkinio greičiau nei 3000 × g ir ilgiau nei 10 sekundžių. Nenaudokite centrifugos „pulsinės“ parinkties. Tą padarius, kodų rinkinys gali iškristi į nuosėdas.
8. Hibridizacijos reakcijas laikykite, esant 65 °C, kol jos bus paruoštos perkėlimui į Prep stotelę. Kaitinimo bloko nustatymas sumažinti temperatūrą iki 4 °C arba mėginių laikymas ant ledo hibridizacijos pabaigoje gali lemti kryžminę hibridizaciją, kuri gali iškreipti tyrimo rezultatus.
9. Nepavykus juostinių mėgintuvėlių padėti 65 °C temperatūroje per 15 minučių nuo fiksavimo zondų rinkinio pridėjimo, gali įvykti kryžminė hibridizacija, kuri gali iškreipti tyrimo rezultatus.
10. Nepavykus pradėti Prep stotelės apdorojimo per 15 minučių nuo mėginių išėmimo iš 65 °C, gali įvykti kryžminė hibridizacija, kuri gali iškreipti tyrimo rezultatus.
11. Įsitikinkite, kad juostinių mėgintuvėlių dangteliai yra sandariai uždaryti prieš hibridizaciją kaitinimo bloke, kad išvengtumėte garavimo, kuris gali iškreipti tyrimo rezultatus.

6 MOKYMŲ INFORMACIJA

Numatyta, kad šį tyrimą turi atlikti profesionalūs naudotojai, kurie apmokyti dirbti taikant labai sudėtingus molekulinės biologijos metodus, remiantis vietiniais reglamentais. Dėl mokymų informacijos, kuri specifinė atliekant Prosigna tyrimą, prašom susisiekti su NanoString.

7 ATLIEKŲ TVARKYMAS

Informacijos apie atliekų tvarkymą, susijusios su reagentais ir prietaisais, naudojamais IVD taikymuose, rasite nCounter Dx analizinės sistemos naudotojo vadove.

8 LAIKYMAS IR TVARKYMAS (REAGENTŲ)

Visų tyrimo rinkinio komponentų galiojimo datos yra pateiktos ant brūkšninio kodo etiketės, kuri tiekama su kodų rinkinio dėžute, bei ant visų Prosigna komponentų išorinių dėžučių etikečių.

- Prosigna kodų rinkinio dėžutės komponentai (Prosigna reporterinių kodų rinkinys, Prosigna fiksavimo zondų rinkinys ir Prosigna RNR palyginamasis mėginys) turi būti laikomi, esant -80 °C arba žemesnei temperatūrai.
- nCounter kasetės turi būti laikomos, esant -20 °C arba žemesnei temperatūrai.
- nCounter Prep plokštelės turi būti laikomos, esant 4 °C (2–8 °C).
- nCounter Prep pakuotės komponentai turi būti laikomi, esant 15 °C – 25 °C kambario temperatūrai.

9 PROSIGNA REIKALINGI PRIETAISAI

- nCounter Dx analizinė sistema (katalogo numeris NCT-SYST-DX) (apima abu toliau nurodytus prietaisus)
 - o nCounter Prep stotelė 5s (katalogo numeris NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - o nCounter skaitmeninis analizatorius 5s (katalogo numeris NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Papildomos informacijos rasite nCounter Dx analizinės sistemos naudotojo vadove.

10 REIKALINGI, BET NEPATEIKTI REAGENTAI IR ĮRANGA

10.1 Medžiagos

1. FFPE RNR išskyrimo rinkinys (išskyrimo rinkinio reikalavimus žr. 11.5 skyriuje, jei nenaudojate Roche FFPET RNR išskyrimo rinkinio, įsigyto iš NanoString Technologies).
2. Hematoksilinas ir eozinas (H ir E).
3. Teigiamai įkrauti, stikliniai mikroskopo objektiniai stiklėliai.
4. D-limoneno plovimo agentas (histologinės klasės).
5. 100 % etanolis (absoliutus), ACS klasės arba lygiavertis (ne mažiau nei 99,5 %).
6. Glicerolis, molekulinės biologijos klasės.
7. Vanduo be nukleazų, molekulinės biologijos klasės.
8. 10 % NDS, molekulinės biologijos klasės.
9. Skustuvo peiliukai (arba vienkartiniai skalpeliai).
10. Vienkartiniai mikrotomo peiliai.
11. 0,5 mL užsukamaisi dangteliai ir 1,5 mL arba 1,7 mL nelipnūs mikrocetrifuginiai mėgintuvėliai be RNazių.
12. Mikropipetų antgaliai be RNazių, turintys barjerą aerozoliams.

10.2 Įranga

1. Mikrotomas
2. Vandens vonelė (40 °C)
3. Objektinių stiklėlių šildytuvai (45 °C)
4. Mikroskopo objektinių stiklėlių džiovavimo stovas
5. Mikropipetės: 2 µL, 20 µL, 200 µL ir 1000 µL
6. Minicentrifuga su 0,2 mL juostinių mėgintuvėlių rotoriumi ir standartinių 1,5 / 2,0 mL mikrocentrifuginių mėgintuvėlių rotoriumi
7. Standartinė stalinė mikrocentrifuga su fiksuoto kampo rotoriumi, kuris tinka 1,5 mL centrifuginiams mėgintuvėliams
8. Stačiakampio formos stikliniai dažymo indai su dangteliais (apytiksliai vidiniai matmenys yra 3,6 × 2,8 × 2,4" (91 × 71 × 60 mm); reikalingi 3 indai.
9. Objektinių stiklėlių stovas (laiko iki dešimties 3" × 1" (75 × 25 mm) stiklinių objektinių stiklėlių)
10. Sauso kaitinimo blokas, stacionarus
11. Stalinė sukurinė maišyklė, skirta mikrocentrifuginiams mėgintuvėliams
12. Graduotas cilindras (rekomenduojamas tūris: 100–250 mL)
13. Disekcijos adata arba dengiamųjų stiklėlių pincetas (kampuotas, nedantytas)
14. Sukalibruoti termometrai (apimantys temperatūrų intervalą nuo 55 °C iki 80 °C)
15. Mikrotūrių UV/Vis spektrofotometras (žr. toliau pateiktas charakteristikas)
16. Kaitinimo blokas su kaitinamu dangčiu (žr. toliau pateiktas charakteristikas)
17. Centrifuga su plokšteliniu mikroplokštelių adapteriu (žr. toliau pateiktas charakteristikas)
18. Objektinių stiklėlių dažymo indas (Coplin)

10.3 Įrangos charakteristikos

1 lentelė. Viso spektro mikrotūrių UV/Vis spektrofotometras, skirtas kiekybiniam nukleorūgščių įvertinimui

Konstrukcijos funkcija	Charakteristikos
Mėginių tūrio intervalas	1–2 µL
Kelio ilgis	1 mm
Bangos ilgių intervalas	260–280 nm
Bangos ilgių tikslumas arba paklaida	± 1 nm
Spektro skiriamoji geba arba juostos plotis	Mažesnis arba lygus 4 nm
Sugerties tikslumas arba atsitiktinė fotometrinė paklaida	0,003 (1 mm kelyje)
Aptikimo riba	5 ng/µL RNR
Didžiausia koncentracija	≥ 1000 ng/µL RNR

2 lentelė. Mikrotūrių fotodiodinis UV/Vis spektrofotometras, skirtas kiekybiniam nukleorūgščių įvertinimui

Konstrukcijos funkcija	Charakteristikos
Mėginių tūrio intervalas	1–2 µL
Kelio ilgis	0,5 mm
Bangos ilgių intervalas	260 ir 280 nm
Spektro skiriamoji geba	Mažesnis arba lygus 8 nm
Sugerties tikslumas	3 % (kai sugertis lygi 1,05 Abs, esant 260 nm)
Aptikimo riba	4 ng/µL RNR
Didžiausia koncentracija	≥ 1000 ng/µL RNR

3 lentelė. Kaitinimo blokas su kaitinamu dangčiu, skirtas tyrimo hibridizacijai

Konstrukcijos funkcija	Charakteristikos
Kaitinimo bloko konstrukcija	- Turi atitikti įprastinį kontūrą, 12 x 0,2 mL įtvirtintų juostinių mėgintuvėlių, kurie yra tiekiami kaip nCounter Prep pakuotės dalis. - Kaitinimo blokai, kurie sukonstruoti žemo kontūro ir aukšto kontūro mėgintuvėliams, yra nesuderinami (taip pat vadinami „greitaisiais“ termociklinimo blokais). - Kaitinimo blokai, kurie sukonstruoti kitokiems mėgintuvėlių tipams (pvz., 0,1 mL mėgintuvėliams, 1,5 mL mėgintuvėliams), yra nesuderinami. - Turi būti programuojamas, kad gebėtų palaikyti 65 °C temperatūrą. - Turi palaikyti temperatūrą 65 °C ±1 °C ribose.
Kaitinamo dangčio konstrukcija	- Fiksuoto arba reguliuojamo aukščio dangteliai yra priimtini. - Dangtelis turi būti programuojamas 70 °C temperatūrai.

4 lentelė. Centrifuga su mikroplokštelių laikikliu, skirta nCounter Prep plokštelių sukimui

Konstrukcijos funkcija	Charakteristikos
Centrifugavimo greitis	Mažiausias greitis 2000 × g
Rotoriai	4 x 750 mL švytuoklinių kaušelių rotoriai su mikroplokštelių laikikliais (arba jiems lygiaverčiai), talpinantys SBS formato 96 šulinėlių mikroplokšteles
Režimai	Greitėjimo / lėtėjimo režimai

11 MĖGINIŲ PAĖMIMAS IR APDOROJIMAS

11.1 Reikalavimai audinių mėginiams ir patologijų apžvalga

- Prosigna krūties vėžio prognostinių genų žymenų tyrimas turi būti atliekamas su formalinu užfiksuotu, parafinu imobilizuoto (FFPE) hormonų receptoriams teigiamo krūties navikinio audinio mėginiu, kurį patologas vėliau priskiria vienam iš šių invazinės krūties karcinomos tipų:
 - Invazinei duktalinei karcinomai
 - Invazinei lobulinei karcinomai
 - Invazinei karcinomai su duktalinėmis ir lobulinėmis savybėmis („mišraus tipo karcinoma“)
 - Neišskirtiniam tipui (NST) arba kitaip neapibrėžtam (NOS)
- Šiam testui patologas turi pasirinkti FFPE naviko bloką su didžiausiu gyvybingu invazinio krūties karcinomos paviršiumi.
- Testui reikalingas ant objekcinio stiklio uždėtas nedažytas audinio pjūvis, kuris naudojamas tyrimui, ir atitinkamas H ir E nudažytas objekcinis stiklis iš FFPE naviko bloko.
- Rekomenduojama, kad audinių pjūviai, kurie naudojami tyrimui, būtų išpjunami greta audinio pjūvio, kuris išpjautas H ir E dažymui. Taip užtikrinama, kad naviko sritis, kuri identifikuota ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio, tinkamai reprezentuoja naviko sritis, esančias ant nedažytų objektnių stiklių.
- Patologas ant H ir E objekcinio stiklio turi apibrėžti gyvybingą, invazinės krūties karcinomos regioną ir atmesti supantį nenavikinį audinį.
- Patologas arba apmokytas laboratorijos techninis darbuotojas privalo pateikti apytikslį naviko ląstelių skaičių ir naviko paviršiaus plotą apibrėžtame regione ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio.
 - Naviko ląstelių skaičiaus procentingumas ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio turi būti ≥ 10 %
 - Ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio apibrėžtas naviko paviršiaus plotas turi būti ≥ 4 mm²

*Atkreipkite dėmesį, kad navikinių ląstelių skaičiaus procentingumas atitinka gyvybingų navikinių ląstelių procentingumą apibrėžtame naviko plote.
- Rekomenduojama testui naudoti mėginius, kurių bendras naviko paviršiaus plotas yra didesnis nei 100 mm². Toliau esančioje lentelėje pateikti duomenys apie objektnių stiklių skaičių, kuris rekomenduojamas, remiantis pamatuotu naviko paviršiaus plotu, esančiu ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio.
- Jeigu audinio peržiūros procesas parodo, kad naviko blokas yra nepakankamo paviršiaus ploto arba tai, kad yra nepakankamas ląstelių skaičius, tuomet gali būti vertinamas kitas to paties naviko blokas. Jeigu nėra FFPE blokų, kuriuose būtų pakankamai navikinio audinio, tuomet Prosigna tyrimas neturi būti atliekamas. Atkreipkite dėmesį, kad jeigu naviko paviršiaus plotas yra mažesnis negu 20 mm², labiau tikėtina, jog RNR įvesties reikalavimai nebus tenkinami.

5 lentelė. Rekomenduojami objektnių stiklių reikalavimai, kurie paremti naviko paviršiaus plotu

Pamatuotas naviko paviršiaus plotas, esantis ant H ir E nudažyto objekcinio stiklio (mm²)	Nedažytų objektnių stiklių skaičius
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Mėginių paėmimas ir laikymas

- Šie veiksmai gali būti atliekami laikantis laboratorijos standartinių darbo metodų: audinių paėmimas ir fiksavimas formalinu, FFPE naviko bloko apdorojimas ir laikymas bei objekcinio stiklio, ant kurio uždėtas FFPE audinys, gabenimas.
- Ant objektnių stiklių uždėti FFPE audinio pjūviai turi būti laikomi atsižvelgiant į laboratorijos standartinius darbo metodus. Jeigu laikomi ilgesnį laiką (> 30 dienų), šie objektniai stikliai turi būti laikomi sausoje aplinkoje ir apdorojami per 9 mėnesius, siekiant užtikrinti testo rezultatų kokybę.

11.3 Objekcinio stiklio paruošimas

- Naudodami mikrotomą, atlikite a 4-5 μm storio pjūvius, kurie bus naudojami H ir E dažymui.
- Naudodami mikrotomą, atlikite 10 μm storio pjūvius, kurie bus naudojami Prosigna tyrimo metu.
- Pamerkite pjūvius į 40 °C temperatūros vandens vonelę.
- Uždėkite pjūvius ant teigiamai įkrautų, stiklinių mikroskopinių objektnių stiklių.
- Leiskite objektniams stikliams nudžiūti ore.
- Kaitinkite objektnius stiklius per naktį, esant 45 °C temperatūrai.

11.4 Objekcinio stiklio apdorojimas

- Paruoškite darbinį 3 % glicerolio tirpalą, sumaišydami 1,5 mL glicerolio koncentratą su 48,5 mL molekulinės klasės vandens be nukleazių. Tinkamai pamatuokite. Supilkite tirpalą į Coplin indą, kuris skirtas objektnių stiklių apdorojimui.
 - Įpilkite maždaug 200-250 mL D-limoneno plovimo agento į du dažymo indus, užtikrindami, kad objektnių stiklių stovė esantys objektniai stikliai būtų visiškai panardinti.
 - Įpilkite maždaug 200-250 mL absoliutaus etanolio (EtOH) į trečią dažymo indą.
 - Nedažytą objektnį stiklį, ant kurio uždėtas audinio pjūvis (-iai), įstatykite į objektnių stiklių stovą.
 - Objektnių stiklių stovą įdėkite į pirmą dažymo indą su D-limonenu ir objektnių stiklių stovą 10-15 sekundžių švelniai judinkite pirmyn ir atgal. Stovą palaikykite pirmame dažymo inde su D-limonenu iš viso 2 minutes.
 - Perkelkite objektnių stiklių stovą iš pirmo dažymo indo su D-limonenu į antrą indą su D-limonenu. Objektnių stiklių stovą 10-15 sekundžių švelniai judinkite pirmyn ir atgal. Objektnių stiklių stovą palaikykite antrame dažymo inde su D-limonenu iš viso 2 minutes. Įsitikinkite, kad visas parafinas buvo pašalintas; jei ne, stovą palaikykite antrame dažymo inde su D-limonenu apytiksliai dar 1 minutę.
 - Perkelkite objektnių stiklių stovą iš antro dažymo indo su D-limonenu į plovimo EtOH indą. Objektnių stiklių stovą 10-15 sekundžių švelniai judinkite pirmyn ir atgal ir išimkite praėjus 2 minutėms.
 - Leiskite objektniams stikliams 10-15 minučių džiūti ore arba tol, kol jie visiškai nudžiūsi ir audinys pasidarys baltas (tai gali užtrukti ilgiau, priklausomai nuo audinio dydžio).
 - Nugarinėje nedažyto (-ų) objekcinio (-ių) stiklio (-ių) pusėje apibrėžkite naviko regioną, jį sulygiuodami su atitinkamu H ir E nudažytu objektniu stikliu ir perkeldami apibrėžtą regioną.
 - Vienu metu dirbdami su vienu objektniu stikliu rehidratuokite audinį, esantį ant apibrėžto, nedažyto objekcinio stiklio. Tai atlikite objektnį stiklį panardindami į 3 % glicerolio tirpalą.
 - Pašalinkite glicerolio perteklių nuo objekcinio stiklio, naudodami laboratorinę šluostę.
 - Apdorodamas kelis objektnius stiklius, naudotojas gali leisti jiems nudžiūti džiovinimo stovė, kol atliekama kitų objektnių stiklių rehidracija.
 - Nugrandykite visą nenavikinį audinį, kuris supa apibrėžtą naviko regioną, naudodami skustuvo peiliuką arba skalpėlį, ir jį išmeskite.
 - Vieną objekcinio stiklio galą laikykite, o kitą atremkite į kietą paviršių 45 laipsnių kampą, tada surinkite makroskopiškai nupjautą navikinį audinį ant skustuvo peiliuko krašto. Surinkimo metu audinys turi lengvai „garbanotis“ ant skustuvo peiliuko.
 - Anksčiau aprašytą veiksmą pakartokite su kiekvienu to paties mėginio objektniu stikliu.
- Pastaba.** Keli nedažyti to paties FFPE mėginio objektniai stikliai gali būti surenkami ant to paties skustuvo peiliuko.

16. Atsargiai nustumkite to paties mėginio audinio pjūvius į pažymėtą 1,5 mL mikrocentrifuginį mėgintuvėlį.
17. Jeigu buvo naudojama, nuvalykite disekcijos adatą arba pincetą, kelioms sekundėms panardindami juos į D-limoneną, o tada nudžiovinkite naudodami audinio mėginius.

11.5 RNR išskyrimas

NanoSting rekomenduoja naudoti Roche FFPET RNR išskyrimo rinkinį, kuris buvo specialiai patvirtintas naudojimui drauge su Prosigna.

Kiti RNR išskyrimo rinkiniai gali būti naudojami, norint paruošti Prosigna mėginius, jeigu jais galima išgauti RNR iš ant objektinių stiklėlių su uždėtų FFPE krūties navikinio audinio pjūvių, ir jeigu jie atitinka šias specifikacijas:

6 lentelė. RNR išskyrimo rinkinio specifikacijos

Parametras	Testas arba matavimas	Specifikacija
RNR koncentracija	Optinis tankis, esant 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ L
Bendras RNR tūris (μ L)	Bendras nuplautos tūris	≥ 12 μ L
RNR grynumas	Optinio tankio santykis, esant 260 nm, su optiniu tankiu, esant 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7–2,3
DNR priemaišos	Genominės DNR turinys nuplautame RNR mėginyje	≤ 1 ng/ μ L
RNR vientisumas	Išskirtos RNR fragmentų dydžio pasiskirstymas	≥ 90 % išskirtos RNR fragmentų turi būti > 100 nukleotidų ilgio

RNR išskyrimo procedūra

Jeigu naudojate ne Roche FFPET RNR išskyrimo rinkinį, išskirkite RNR iš makroskopiskai išskrosto navikinio audinio, laikydamiesi gamintojo instrukcijų.

Toliau išvardytos instrukcijos yra skirtos Roche FFPET RNR išskyrimo rinkiniui, kurį rekomenduojama naudoti drauge su Prosigna. Informacijos ieškokite Roche FFPET RNR išskyrimo rinkinio informaciniame lapelyje bei laikymo, saugos ir darbo instrukcijose.

Darbinių tirpalų paruošimas

1. Darbinius tirpalus paruoškite prieš pradėdami audinių ardymą ir RNR išskyrimą:

Darbinių tirpalų paruošimas	
Reagentas	Procedūra
Plovimo buferinis tirpalas I (WB1)*	Pridėkite 15 mL 100 % etanolio, paruoštą WB1 laikykite nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje.
Plovimo buferinis tirpalas II (WB2)*	Pridėkite 80 mL 100 % etanolio, paruoštą WB2 laikykite nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje.
Proteinazė K (PK)	Liofilizuotą proteinazę K ištirpinkite 4,5 mL reagentų paruošimo buferinio tirpalo (RPB). Paruoškite 600 μ L porcijas, pažymėkite etiketėmis ir jas laikykite nuo -15 °C iki -25 °C temperatūroje.
DNazė I (DNase I)*	Liofilizuotą DNazę I ištirpinkite 740 μ L reagentų paruošimo buferinio tirpalo (RPB). Paruoškite 50 μ L porcijas, pažymėkite etiketėmis ir jas laikykite nuo -15 °C iki -25 °C temperatūroje.

Pastaba. Žvaigždute (*) pažymėti komponentai yra nebūtinai tol, kol audiniai yra nesuardyti.

Audinių ardymas

1. Atšildykite pakankamą proteinazės K (PK) porciją skaičių. Atšildę, porcijas laikykite ant ledo tol, kol būsite pasiruošę naudoti.
Pastaba. Vienoje 600 μ L PK porcijoje esančios proteinazės K pakanka 4 audinių ardymams.
2. Į mėginių mėgintuvėlius su audiniu pridėkite po 100 μ L audinių lizės buferinio tirpalo (TLB), 16 μ L 10 % NDS ir 120 μ L darbinio proteinazės K tirpalo.
3. Mėginių mėgintuvėlius su audiniu maišykite kelias sekundes, naudodami sukurinę maišyklę, ir trumpai pasukite.
4. Inkubuokite 55 °C temperatūroje per naktį (12–23 valandas).

RNR išskyrimas

1. Apžiūrėkite mėginių mėgintuvėlius, kad nustatytumėte, ar audinys yra visiškai suardytas. Visiškai suirus, tirpalas atrodo skaidrus ir jame yra labai mažai arba iš viso nebėra audinio.
a. Jeigu ardymas yra baigtas, pereikite prie kito veiksmo.

- b. Jeigu ardymas yra nebaigtas, papildomai pridėkite 20 μ L proteinazės K ir inkubuokite dar vieną valandą.
2. Trumpai pasukite visus mėginius (<30 sekundžių minicentrifugoje).
3. Mėginius inkubuokite 15 minučių 80 °C temperatūroje.
4. Paruoškite arba atšildykite pakankamą DNazės porciją skaičių. Atšildę, porcijas laikykite ant ledo tol, kol būsite pasiruošę naudoti.
Pastaba. Vienoje 50 μ L DNazės porcijoje DNazės pakanka 4 RNR išskyrimams.
5. Atskieskite DNazę DNazės inkubavimo buferiniame tirpale (DIB). Reikalingas kiekis N (skaičiui) RNR išskyrimų yra: $(N+1) \times 90$ μ L DNazės inkubavimo buferiniame tirpale + $(N+1) \times 10$ μ L DNazės. Praskiestą DNazės tirpalą laikykite ant ledo tol, kol būsite pasiruošę naudoti.
6. Į kiekvieną mėginį pridėkite 325 μ L parafino prijungimo buferinio tirpalo (PBB) ir 325 μ L absoliutaus etanolio ir išmaišykite naudodami pipetę.
7. Trumpai pasukite (<30 sekundžių minicentrifugoje).
8. Aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlį uždėkite ant aukšto grynumo surinkimo mėgintuvėlio.
9. Pipete perkelti mėginį į viršutinį filtravimo mėgintuvėlio rezervuarą. Venkite bet kokių audinių likučių.
10. Centrifuguokite 30 sekundžių, esant 6000 $\times g$.
11. Aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlį uždėkite ant naujo aukšto grynumo surinkimo mėgintuvėlio (ankstesnį surinkimo mėgintuvėlį su pratekėjusiu turiniu išmeskite).
12. Centrifuguokite 2 minutes, esant 16000 $\times g$, kol filtro medžiaga bus visiškai sausa.
13. Aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlį uždėkite ant naujo aukšto grynumo surinkimo mėgintuvėlio (ankstesnį surinkimo mėgintuvėlį su pratekėjusiu turiniu išmeskite).
14. Įleiskite 100 μ L skiestos DNazės tirpalo ant aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlio filtro medžiagos ir inkubuokite 15 minučių nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje.
15. Pridėkite 500 μ L plovimo buferinio tirpalo I (WB1) ant aukšto grynumo filtro medžiagos, centrifuguokite 20–30 sekundžių, esant 6000 $\times g$, pratekėjusį turinį išmeskite.
16. Pridėkite 500 μ L plovimo buferinio tirpalo II (WB2) ant aukšto grynumo filtro medžiagos, centrifuguokite 20–30 sekundžių, esant 6000 $\times g$, pratekėjusį turinį išmeskite.
17. Pridėkite 500 μ L plovimo buferinio tirpalo II (WB2) ant aukšto grynumo filtro medžiagos, centrifuguokite 20–30 sekundžių, esant 6000 $\times g$, pratekėjusį turinį išmeskite.
18. Centrifuguokite 2 minutes, esant 16000 $\times g$, kol visiškai išdžiovinsite filtro medžiagą.
19. Aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlį įdėkite į pažymėtą, 1,5 mL arba 1,7 mL mikrocentrifuginį mėgintuvėlį be RNazės.
20. Įleiskite 30 μ L elucijos buferinio tirpalo (EB) ant aukšto grynumo filtro medžiagos centro.
21. Inkubuokite 1 minutę nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje.
22. Centrifuguokite 1 minutę, esant 6000 $\times g$, kad nuplautumėte RNR nuo kolonėlės. Išimkite ir išmeskite aukšto grynumo filtravimo mėgintuvėlį.
23. Centrifuguokite nuplautą RNR mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje 2 minutes didžiausiu galimu greičiu.
24. Supernatantą perkelti į 0,5 mL užsukamą mėgintuvėlį, nesujudindami stiklo pluošto pirminio mėgintuvėlio apačioje, kuris galėjo nusiplauti nuo filtro medžiagos.
25. Pamatuokite išskirtos RNR koncentraciją tą pačią darbo dieną (laikykite +2 – +8 °C temperatūroje) arba užšaldykite iki naudojimo -70 °C arba žemesnėje temperatūroje.

11.6 RNR koncentracijos ir kokybės matavimas

1. Pamatuokite 2 μ L išskirtos RNR optinį tankį (OD), esant 260 nm ir 280 nm, naudodami spektrofotometrą, kuris atitinka charakteristikas, nurodytas 10.3 skyriuje „Įrangos charakteristikos“. Venkite pipetę paimti 2 μ L tūrį nuo šaltinio mėgintuvėlio apačios, kad apsisaugotumėte nuo stiklo pluošto liekanų, kurios gali trukdyti optinio tankio nuskaitymui.
2. Laikykites spektrofotometro gamintojo instrukcijų dėl RNR matavimo.
3. Jeigu mėginys neatitinka mažiausio RNR grynumo arba koncentracijos (6 lentelė), centrifuguokite mėginio mėgintuvėlį 1 minutę didžiausiu leistinu greičiu ($> 10000 \times g$), padėkite mėgintuvėlį ant ledo ir pakartokite matavimo procesą. Jeigu mėginys ir toliau neatitinka grynumo arba koncentracijos sąlygų, RNR mėginys yra netinkamas analizei naudojant Prosigna tyrimo procedūrą. Prosigna tyrimui nenaudokite nepakankamos kokybės arba nepakankamo kiekio RNR.
4. RNR išskyrimas gali būti kartojamas, jeigu mažiausios koncentracijos arba mažiausio grynumo charakteristikos yra netenkinamos (6 lentelė). Naudotojai gali pasirinkti išskirti papildomų objektinių stiklėlių iš to paties FFPE bloko arba gali pasirinkti atskirą bloką iš tos pačios pacientės.

- Jeigu RNR koncentracija viršija 250 ng/μL, ji turi būti skiedžiama molekulinės klasės vandeniu be RNazių ir DNazių taip, kad būtų pasiekta 200 ng/μL koncentracija prieš toliau atliekant hibridizacijos tyrimą. Naudokitės neskiesto mėginio užfiksuotu 260/280 OD santykio rezultatu, kad nustatytumėte, ar skiestas mėginys tenkina minimalų RNR grynumą, kuris lygus 1,7.
- Užšaldykite RNR -70 °C arba žemesnėje temperatūroje, jeigu Prosigna tyrimas negali būti baigtas per tą pačią darbo dieną.

11.7 Tyrimo procedūra

Ši tyrimo procedūra aprašo veiksmus, kurie būtini norint atlikti Prosigna tyrimą, kai naudojama NanoString nCounter Dx analizinė sistema. Šiuos veiksmus galima suskirstyti į toliau išvardytas kategorijas per dvi paeilui einančias dienas:

Pirma diena

- Matavimo rinkinio identifikavimo (RSID) įrašo konfigūravimas internetinėje programoje.
- RNR hibridizacijos su Prosigna kodų rinkiniu konfigūravimas (30 minučių konfigūravimas, 15–21 valandos hibridizacija).

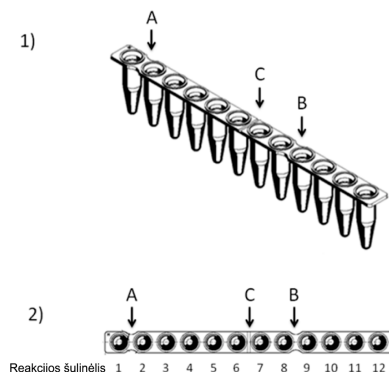
Antra diena

- Prep stotelės konfigūravimas ir paleidimas (20 minučių konfigūravimas, 2–3 valandų tyrimas, atsižvelgiant į tiriamų mėginių skaičių).
- konfigūravimas ir nuskaitymas, naudojant skaitmeninį analizatorių (5 minutės konfigūracijai, 2,5–4,5 valandos kiekvienai kasetei, atsižvelgiant į tiriamų mėginių skaičių).
- Atskaitos gavimas (30 minučių)

Pacientės mėginių parinkimas ir partijos nustatymas

- Nuspręskite, kurie pacientės mėginiai bus atliekamo testo dalis. Vienos serijos metu gali būti tiriama iki 10 mėginių.
 - Kiekvienas serijos mėginys bus priskirtas unikaliai, hibridizacijai naudoto 12 šulinėlių juostinio mėgintuvėlio vietai, kuri prietaise registruojama kaip matavimo rinkinio ID dalis (matavimo rinkinio ID įvedamas internetinėje programoje). Atkreipkite dėmesį, kad 1 ir 2 vietos yra rezervuotos palyginamajam mėginiui, o 3–12 padėtyms skirtos navikinės RNR mėginiams.
 - Toliau esantis paveikslas iliustruoja juostinių mėgintuvėlių vaizdą iš šono 1) ir vaizdą iš viršaus 2). Juostiniai mėgintuvėliai yra asimetriškai sutvirtinti tarp 1 ir 2 (A) bei 8 ir 9 (B) reakcijos šulinėlių, kad būtų išlaikytas mėginių išdėstymas atliekant tyrimą. Be to, juostiniai mėgintuvėliai yra įkirsti tarp 6 ir 7 (C) reakcijos šulinėlių, kad būtų galima greičiau nukirpti juostinius mėgintuvėlius, jeigu tą atlikti būtina, kad mėgintuvėliai tilptų į standartinės centrifugos adapterius.

6 paveikslas. Sutvirtintų juostinių mėgintuvėlių iliustracija.



- Apskaičiuokite RNR ir vandens (kai jis reikalingas) kiekį, kuris bus pridėdamas į hibridizacijos reakciją kiekvienam serijos mėginiui.
 - Rekomenduojamas RNR kiekis tyrimui yra 250 ng. Hibridizacijai priimtinas RNR kiekio intervalas yra 125–500 ng.
 - Apskaičiuokite RNR mėginio tūrį (mikrolitrais), kuris bus pridėdamas į hibridizacijos reakciją, pagedidaujamą mėginio kiekį (pvz., 250 ng) padalydami iš pamatuotos koncentracijos.
 - Jeigu suskaičiuota mėginio koncentracija yra tarp 12,5 ng/μL ir 25 ng/μL, pridėkite didžiausią 10 μL tūrį.

- Mėginiams, kuriems reikia mažiau nei 10 μL, apskaičiuokite vandens tūrį, kuris reikalingas, kad būtų gaunamas 10 μL bendras mėginio tūris.

Pavyzdys. Kai pamatuota mėginio RNR koncentracija yra 85 ng/μL, reikia 2,9 μL mėginio, kad bendra masė būtų 250 ng, ir reikia 7,1 μL vandens, kad būtų gautas 10 μL tūris, prieš pridėdant likusius reagentus. Pagal lygtį: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2,9 \mu\text{L}$

Mėginių registracija ir apdorojimas

Naudodamas nCounter Dx analizinės sistemos paslaugų internetinę programą, naudotojas sukurs unikalią matavimo rinkinio ID kiekvienai mėginių serijai, mėginių ID susiedamas su juostinio mėgintuvėlio vieta (3–12 vietomis). Naudodamas nCounter Dx analizinės sistemos paslaugų internetinę programą, naudotojas informacijos gali ieškoti naudotojo instrukcijose.

- Jeigu RNR prieš naudojimą buvo užšaldyta, prieš tyrimą atlikite šiuos veiksmus:
 - Visiškai atšildykite RNR mėginius ir laikykite juos ant ledo.
 - Atšildyto mėginio mėgintuvėlį centrifuguokite 1 minutę didžiausiu galimu greičiu ($> 10000 \times g$) ir vėl padėkite ant ledo.
 - Pasirinkite tinkamą Prosigna testo rinkinio dydį, atsižvelgdami į tiriamų pacientės mėginių skaičių (1, 2, 3, 4 arba 10). Išimkite toliau nurodytus kodų rinkinio reagentų mėgintuvėlius iš -80 °C temperatūros šaldiklio, kad atšildytumėte. Reagentus laikykite ant ledo, jeigu toliau išvardytų veiksmų neatliksite iš karto.
 - Prosigna reporterinių kodų rinkinys (dangtelis su žaliu lipduku).
 - Prosigna fiksavimo zondų rinkinys (dangtelis su pilku lipduku).
 - Prosigna palyginamasis mėginys (dangtelis be lipduko).
 - Išimkite kodų rinkinio serijos brūkšninio kodo lipduką ir testo konfigūracijos kodą iš kodų rinkinio dėžutės.
 - Naudodamiesi internetine naršykle, prisijunkite prie IVD nCounter Dx analizinės sistemos internetinės programos ir pasirinkite Prosigna tyrimo tipą, kad pradėtumėte skaitmeninių registracijos formų nustatymą.
 - Pagrindiniame puslapyje pasirinkite „Sukurti naują matavimo rinkinį“ (angl. „Create New Run Set“).
 - Pirmasis privalomas Prosigna matavimą apibrėžiantis laukelis yra matavimo rinkinio ID. Šiame matavimo rinkinio ID laukelyje įveskite unikalią identifikatorių, kad galėtumėte identifikuoti mėginių seriją.
 - Nuskenaukite arba rankiniu būdu įveskite testo konfigūracijos kodą internetinėje programoje. Nuskenuotą arba įvestą kodą galima išmesti.
 - Nuskenaukite arba rankiniu būdu įveskite kodų rinkinio numerį internetinėje programoje.
 - Tuomet į atitinkamą mėginio ID laukelį įveskite unikalią ID mėginio, kuris bus įdėtas trečioje juostinių mėgintuvėlių vietoje / šulinėlyje.
 - Naudodami brūkšninių kodų skenerį įveskite pacientės RNR mėginio ID arba mėginio ID įveskite rankiniu būdu naudodami klaviatūrą.
 - Įvedę visų mėginių ID, pažymėkite ir užpildykite laukelius, kuriuose reikia nurodyti mėginio informaciją (bendrą naviko dydį ir mazgelių būklę). Tą padarykite prieš įvesdami kitą mėginį.
 - Nurodykite teigiamų mazgelių skaičių, kuris nustatytas pacientės patologinio įvertinimo metu, kad atliekant testą būtų pasirinkta tinkama mazgelių kategorija (nulinė, 1–3, ≥ 4).
 - Naudokite pamatuotą bendrą naviko dydį arba pacientės patologinio įvertinimo metu nustatytą stadiją, kad atliekant testą būtų pasirinkta tinkama bendro naviko dydžio kategorija ($\leq 2 \text{ cm}$ arba $> 2 \text{ cm}$).
 - Neprivalomame laukelyje „Memo“ kiekvienam mėginiui galima įvesti komentarus.
- Pastaba.** Jeigu kurie nors juostinių mėgintuvėlių šulinėliai / padėtyms yra nereikalingi, atitinkamus laukelius palikite tuščius. Jeigu tiriant daugiau mėginių prireikia papildomų laukelių, naudokite kitą testo konfigūraciją, kuri talpina daugiau mėginių.
- Pabaigus mėginių įvedimą, nurodykite kuriems naudotojams bus pateikiama ši nurodyta informacija:
 - Prep stotelės ir skaitmeninio analizatoriaus matavimų būsenos atnaujinimai.
 - Pranešimas, kad prieinama galutinė ataskaita.
 - Išsaugokite užpildytą matavimo rinkinį.
 - Matavimo rinkinio darbalapis gali būti atspausdintas ir naudojamas mėginių atsekamumo ir tikrinimo tikslais.

Hibridizacijos reakcijos procedūra

Pastaba. Toliau išvardyti veiksmai apima dešimt (10) pacientės mėginių ir du (2) palyginamuosius mėginius.

Pastaba. Necentrifuguokite reporterinio kodų rinkinio didesniu nei $3000 \times g$ greičiu arba ilgiau nei 10 sekundžių bei nenaudokite „pulsinės“ sukimo funkcijos. Jei taip darysite, centrifuga pasieks didžiausią galimą greitį ir gali atskirti kodų rinkinį nuo tirpalo.

- Užprogramuokite kaitinimo bloką pasirinkdami 30 μL tūrį, apskaičiuotą bloko ir dangtelio temperatūrą bei „amžiną“ laiko nustatymą (arba lygiavertį užlaikymo trukmės nustatymą). Kaitinimo bloko temperatūrą nustatykite lygią 65 °C, o kaitinamo dangtelio temperatūrą – 70 °C.

Pastaba. Atliekant toliau išvardytus veiksmus, ypač svarbu išlaikyti eiliškumą, kai mėginiai pridėjami į juostinius mėgintuvėlius, ir tokiu būdu užtikrinti, kad jis atitiktų matavimo rinkinio ID nurodytą eiliškumą.

- Sužymėkite pateiktą 12 šulinėlių juostinį mėgintuvėlį tam, kad atskirtumėte 1–6 vietas nuo 7–12 vietų (žr. juostinio mėgintuvėlio iliustraciją).
- Jeigu būtina, perkirpkite juostinį mėgintuvėlį per pusę taip, kad jis tilptų minicentrifugoje su juostinio mėgintuvėlio adapteriu.
- Naudodamiesi pipete, įleiskite 10 μL palyginamojo mėginio į 1 ir 2 sužymėto juostinio mėgintuvėlio vietas.
- Naudodamiesi pipete, į atitinkamas sužymėto juostinio mėgintuvėlio vietas įleiskite apskaičiuotą vandens tūrį, kuris reikalingas kiekvienam mėginiui.
- Naudodamiesi pipete, į atitinkamas sužymėto juostinio mėgintuvėlio vietas įleiskite apskaičiuotą RNR tūrį, kuris reikalingas kiekvienam mėginiui. Kiekvienam mėginiui naudokite naują pipetės antgalį.
- Kai pacienčių mėginiai įleisti į juostinį mėgintuvėlį, rekomenduojama mėgintuvėlius su mėginiais įstatyti į jiems skirtą stovą, išlaikant mėginių pridėjimo juostiniame mėgintuvėlyje eiliškumą. Tai skirta, kad būtų patikrinta, ar mėginiai buvo pridėti pagal numatytą eiliškumą, kai visi mėginiai įleidžiami į juostinį mėgintuvėlį.
- Kai visi mėginiai buvo įleisti į juostinį mėgintuvėlį, patikrinkite, ar buvo išlaikytas mėginių eiliškumas juostiniame mėgintuvėlyje (mėginių eiliškumo patikrinimui gali būti naudojamas matavimo rinkinio darbalapis).

- Esant poreikiui, internetinėje programoje pageduokite matavimo rinkinio ID, kad mėginių eiliškumas atitiktų galutinį išdėstymą (esančio matavimo rinkinio ID redagavimo instrukcijas žr. nCounter Dx analizinės sistemos naudojimo vadovą).

- Po to, kai mėginių eiliškumas buvo patvirtintas, atskirus mėgintuvėlius su RNR mėginiais grąžinkite ant ledo.
- Sukurkite bazinį mišinį, susidedantį iš 130 μL hibridizacijos buferinio tirpalo ir 65 μL reporterinio kodų rinkinio.

Pastaba. Jeigu reporterinis kodų rinkinys buvo laikomas ant ledo, leiskite jam pasiekti kambario temperatūrą, palaukdami 1 minutę prieš pridėdami hibridizacijos buferinio tirpalo.

- Bazinį mišinį sumaišykite pipete ir trumpai centrifuguokite.
- Pipete įleiskite po 15 μL bazinio mišinio į kiekvieną iš 12 šulinėlių. Kiekvienam šulinėliui naudokite naują pipetės antgalį.

Pastaba. Užbaigus kitą veiksmą, juostinis mėgintuvėlis turi būti dedamas į kaitinimo bloką, kuriame palaikoma 65 °C temperatūra, ir ten laikomas 15 minučių.

- Į kiekvieną šulinėlį įleiskite po 5 μL fiksavimo zondų rinkinio. Kiekvienam šulinėliui naudokite naują pipetės antgalį.
- Uždenkite juostinio mėgintuvėlio šulinėlius ir sumaišykite reagentus keletą kartų apversdami juostinį mėgintuvėlį bei pastuksendami pirštu, kad jie būtų visiškai sumaišyti.

- Trumpai pasukite mėginius, esančius juostiniame mėgintuvėlyje, naudodami pikofugą arba minicentrifugą (greitis < $3000 \times g$).

Pastaba. Naudokite pikofugą, kurioje gali tilpti 12 šulinėlių juostinį mėgintuvėlį, arba, esant poreikiui, minicentrifugą, kurioje gali tilpti perkirpti juostiniai mėgintuvėliai.

- Juostinį (-ius) mėgintuvėlį (-ius) įdėkite į 65 °C kaitinimo bloką su kaitinamu dangčiu. Hibridizacijos tyrimus inkubuokite 65 °C temperatūroje 15–21 valandą. Hibridizacijos turi būti laikomos 65 °C temperatūroje tol, kol bus pasiruošta apdorojimui Prep stotelėje.

Pastaba. Išmeskite visus nepanaudotus kodų rinkinius.

Mėginių apdorojimas nCounter Prep stotelėje

- Suraskite su skaitmeniniu analizatoriumi susietą Prep stotelę.
- Išimkite nCounter kasetę, kuri buvo laikoma -20 °C temperatūroje, ir neišimdami iš folijos pakuotės palaukite 10–15 minučių, kol ji pasieks kambario temperatūrą.

Pastaba. Užtikrinkite, kad komponentai iš tos pačios partijos būtų naudojami drauge.

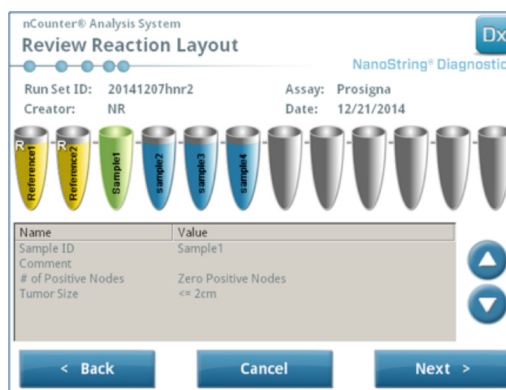
- Kai kasetė pasieks kambario temperatūrą, prieš uždėdami kasetę ant Prep stotelės pagrindo, išimkite ją iš folijos pakuotės.

- Išimkite nCounter Prep plokštelę (-es), kuri (-ios) buvo laikoma (-os) 4 °C temperatūroje, ir palaukite 10–15 minučių, kol ji (jos) pasieks kambario temperatūrą.

Pastaba. Tyrimams, kurie atliekami naudojant 1, 2, 3 arba 4 testų Prosigna rinkinius, reikalinga tik viena Prep plokštelė.

- Prieš padėdami Prep plokšteles ant Prep stotelės pagrindo, plokšteles centrifuguokite $2000 \times g$ greičiu 2 minutes, kad surinktumėte skystis šulinėlių apačioje.
- Kol kasetės ir Prep plokštelė (-ės) turi pasiekti kambario temperatūrą, paruoškite Prep stotelę su nCounter Prep pakuotės naudojamomis medžiagomis.
- Naudodami nCounter Prep stotelės jutiklinio ekrano sąsają, savo tyrimui pasirinkite diagnostikos (angl. „Diagnostics“) mygtuką.
- Pagrindinio meniu ekrane pasirinkite mėginių apdorojimo (angl. „Process Samples“) mygtuką, esantį jutiklinio ekrano sąsajoje.
- Peržiūrėkite ekrane rodomą prieinamų matavimo rinkinių ID (RSID) sąrašą, kad patvirtintumėte šiuo metu apdorojamų mėginių RSID.
- Paliesdami ekraną pasirinkite RSID ir jutiklinio ekrano sąsajoje pasirinkite „Kitas“ (angl. „Next“).
- Jutiklinio ekrano sąsajoje patvirtinkite, kad buvo pasirinktas teisingas RSID. Tą padarykite ekrane apžiūrėdami kiekvieną mėgintuvėlį ir patikrindami mėginių informaciją.
 - Mėginių atsekamumui ir patikrai čia gali būti naudojamas matavimų rinkinio darbalapis.
 - Jeigu buvo pasirinktas neteisingas RSID, palieskite grįžimo (angl. „Back“) mygtuką ir pasirinkite teisingą RSID.
 - Jeigu RSID teisingas, tačiau yra mėginių įvesties klaidų, palieskite grįžimo (angl. „Back“) mygtuką, pereinantį į kompiuterio darbalaukį ir pakoreguokite RSID internetinėje programoje.

7 paveikslas. Prep stotelės matavimo ekranas



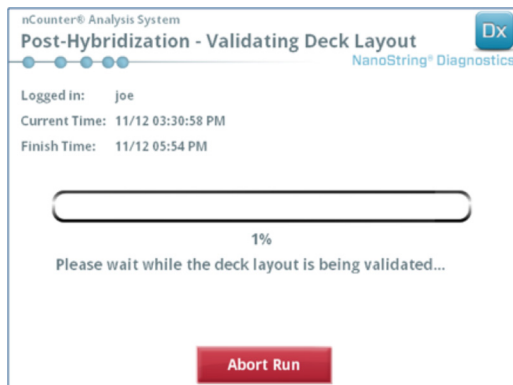
- Keliuose tolesniuose ekranuose jūsų bus prašoma atvirose laukeliuose nuskenuoti reikiamą reagentų brūkšninio kodo ID arba patvirtinti reikiamų naudojamų medžiagų padėjimą ant pagrindo. Atlikę kiekvieną užduotį, jutikliniame ekrane pasirinkite „Kitas“ (angl. „Next“), kad pereitumėte prie kitos užduoties.

Pastaba. Tyrimams, kurie atliekami naudojant 1, 2, 3 arba 4 testų Prosigna rinkinius, reikalinga tik viena Prep plokštelė ir vienas tuščias juostinis mėgintuvėlis. Atlikdami tyrimus su 1, 2, 3 arba 4 testų rinkiniais, padėkite Prep plokštelę ir tuščią juostinį mėgintuvėlį į atitinkamas padėtis priekyje (arčiausiai naudotojo) ant Prep stotelės pagrindo.

- Išimkite mėginius iš kaitinimo bloko.
- Pastaba.** Tyrimą naudojant Prep stotelę pradėkite per 15 minučių po mėginių išėmimo iš kaitinimo bloko.
- Juostinį (-ius) mėgintuvėlį (-ius) įstatykite į pikofugą arba minicentrifugą ir trumpai pasukite (greitis < $3000 \times g$).
- Atsargiai nuimkite mėgintuvėlių dangtelius nuo juostinio (-ių) mėgintuvėlio (-ių).
- Juostinio mėgintuvėlio įpjovos ir Prep stotelės žymės turi atitikti mėginių eiliškumą ir padėtį.
- Juostinį (-ius) mėgintuvėlį (-ius) padėkite taip, kad 1–12 šulinėliai ant nCounter Prep stotelės pagrindo būtų išrikiuoti iš kairės į dešinę. Jeigu tyrimas atliekamas naudojant 1, 2, 3 arba 4 testų rinkinius, jei taikoma, tik pirmoji juostinio mėgintuvėlio pusė (1–6 šulinėliai) turi būti įstatyta kairėje mėgintuvėlių laikiklio pusėje ant pagrindo. Atkreipkite dėmesį, kad svarbu naudoti tik 1–6 šulinėlius. Antroji juostinio mėgintuvėlio pusė (7–12 šulinėliai) kairėje laikiklio pusėje netilps dėl mėgintuvėlio su įpjovomis konstrukcijos.
- Patvirtinkite, kad juostiniai mėgintuvėliai yra tvirtai įstatyti Prep stotelėje, ir uždarykite metalinį dangtį.

19. Jeigu dangtis tinkamai neužsidaro, jūs būsite paprašyti jį uždaryti pagrindo išdėstymo patikros metu.
20. Jutiklinio ekrano sąsajoje pasirinkite „Kitas“ (angl. „Next“).
21. Uždarykite prietaiso duris, kai bus nurodyta, ir pasirinkite „Kitas“ (angl. „Next“), kad pradėtumėte pagrindo išdėstymo patikrą.
22. Jeigu įvyksta klaida, vadovaukitės su konkrečia klaida susijusiais nurodymais, kad galėtumėte tęsti pagrindo išdėstymo patikrą.

8 paveikslas. Prep stotelės pagrindo išdėstymo patikra po hibridizacijos.



23. Atlikę pagrindo išdėstymo patikrą, jutiklinio ekrano sąsajoje pasirinkite „Pradėti apdorojimą“ (angl. „Start Processing“).
- Pastaba.** Jeigu paleisdami Prep stotelę susidūrėte su problemomis, sugrąžinkite hibridizuotus mėginius į kaitinimo bloką, bet neviršykite didžiausios leistinos 21 valandos trukmės.
24. Kai procedūra yra baigta, vadovaukitės Prep stotelės nurodymais.
25. Kai Prep stotelė baigia matavimą, atsargiai išimkite kasetę iš Prep stotelės ir užsandarinkite kasetės šulinėlius naudodami pateiktą lipnų kasetės šulinėlių dangtelį.
- Pastaba.** Nepalikite neuždengtos kasetės Prep stotelėje per naktį.
26. Jeigu ne visus mėginius skenuosite tą pačią dieną, kasetę nepermatomoje dėžutėje laikykite 4 °C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.

Kasetės skenavimas naudojant nCounter skaitmeninį analizatorių

1. Suraskite skaitmeninį analizatorių, kuris yra susijęs su Prep stotele, naudota mėginių apdorojimui. Kasetę įdėkite į nCounter skaitmeninį analizatorių skenuoti.
 - a. Atidarykite skaitmeninio analizatoriaus dureles.
 - b. Į tuščią vietą įstatykite kasetę, kurią norite įdėti.
 - c. Uždarykite dureles ir stebėkite jutiklinio ekrano vaizdą.
 2. Skaitmeninio analizatoriaus jutiklinio ekrano sąsajoje rodomi įvairūs vaizdai, kurie padeda greitai įvertinti vietos būseną:
 - a. Tuščia vieta: šis vaizdas yra tuščias ir paruoštas, kad į jį būtų įdėta nauja kasetė.
 - b. Užbaigta mėlyna kasetė: baigtas skenavimas.
- NEIŠIMKITE ŠIŲ KASEČIŲ**
- a. Baltos kasetės: šioje vietoje yra kasetė, kuri yra užregistruota, bet nuskenuota.
 - b. Dalinai mėlynos kasetės: šioje vietoje yra kasetė, kuri yra skenuojama.
3. Kasetės, kurių skenavimas baigtas, gali būti išimtos iš skaitmeninio analizatoriaus.
 4. Jeigu tai yra pirmą kartą į skaitmeninį analizatorių įdėta kasetė, palieskite diagnostikos (angl. „Diagnostics“) mygtuką, tada pasirinkite pagrindinį meniu (angl. „Main Menu“), kad prisijungtumėte prie skaitmeninio analizatoriaus. Jeigu skaitmeninis analizatorius jau skenuoja kasetes, pereikite prie toliau aprašyto 9 veiksmo.
 5. Atsargiai įdėkite kasetę į tuščią skaitmeninio analizatoriaus vietą (žr. prieš tai pateiktą informaciją apie vietos būseną). Vieta ir kasetė yra sužymėti, siekiant padėti užtikrinti tinkamą padėtį. Brūkšninis kodas nukreiptas į viršų.
 6. Nuleiskite vietos dangtelį ir paspauskite kasetę per angą vietos dangtelyje tam, užtikrintumėte, jog kasetė tinkamai įstatyta.
 7. Palieskite skaičiavimo pradžios (angl. „Start Counting“) mygtuką ir laukite, kol skeneris pradės skenavimo procesą. Kai skaitmeninis analizatorius pradės skenuoti kasetę, išgirsite trumpų, ritmiškai spragsinčių garsų seriją.
 8. Įsitikinkite, kad ekrane rodomoje kasetės vietoje atsirado mėlyna juosta (per penkias minutes nuo skenavimo pradžios), reiškianti, kad skenavimas prasidėjo.

9. Norėdami įdėti kasetę į skaitmeninį analizatorių, kuris jau skenuoja kasetes, kasečių skaičiavimo (angl. „Counting Cartridges“) ekrane palieskite pauzės mygtuką (angl. „Pause“) ir laukite, kol skaitmeninis analizatorius laikinai sustabdytų vykdomą skenavimą.
10. Atidarykite skaitmeninio analizatoriaus dureles.
11. Įstatykite kasetę į tuščią langelį (žr. prieš tai pateiktą informaciją apie vietos būseną).
12. Uždarykite dureles ir palieskite „Tęsti“ (angl. „Resume“).
13. Kai skenavimas baigtas, programinė įranga nusiųs ataskaitą anksčiau nurodytais naudotojų elektroninio pašto adresais.
14. Gavę elektroninio pašto pranešimą, išimkite užbaigtą kasetę ir išmeskite laikydamiesi savo institucijos nurodymų.
- Pastaba.** Atsaka bus kuriamos sėkmingai užbaigtoms procedūroms bei procedūroms su klaidomis, kurios yra susijusios su duomenų kokybės kontrole (KK). Atsaka bus generuojamos esant klaidoms, kurios nėra susijusios su duomenų KK. Jeigu taip įvyko, susisiekite su NanoString klientų aptarnavimo skyriumi dėl pagalbos.
15. Naudodamiesi elektroniniame laiške pateikta nuoroda, atidarykite internetinę programą ir parsisiųskite visas testų ataskaitas, kurios susijusios su apdorojamais RSID.
16. Įvykus klaidoms: vykdykite rekomendacijas, pateiktas testo ataskaitoje, atskiram mėginiui arba sistemos klaidoms.

Pastaba. Atskirų mėginių klaidos nėra laikomos sistemos klaidomis.

12 TRIKČIŲ ŠALINIMAS IR TESTO NESĖKMĖS

7 lentelė. Klaidų kodai, dėl kurių reikia kartoti tyrimą

Klaidos kodas	Trikties apibūdinimas	Rekomenduojami veiksmai
5	Skenavimo triktis	Iš naujo paleiskite mėginį su 250 ng RNR
7	Aukštas signalas	Iš naujo paruoškite mėginį ir paleiskite testą su 125 ng RNR
6	Žemas signalas	Iš naujo paruoškite mėginį ir paleiskite testą su 500 ng RNR
30	Žemas signalas	Iš naujo paruoškite mėginį ir paleiskite testą su 500 ng RNR
31	Žemas RNR signalas	Iš naujo paruoškite mėginį ir paleiskite testą su 500 ng RNR

Tyrimo kartojimo priežastys

1. Tyrimo ataskaitoje identifikuojami nesėkmingi mėginiai, o tyrimo rezultatai nepateikiami. Tyrimo rezultatai pateikiami esant tinkamiems mėginiams.
2. Tyrimo ataskaitoje identifikuojamas trikties tipas ir pateikiami rekomenduojami veiksmai tyrimo trikties atveju. Nesėkmingų mėginių RNR koncentracijos gali būti matuojamos pakartotinai, o mėginiai gali būti pakartotinai paleidžiami (kaip naujos serijos / RSID dalis), priklausomai nuo trikties tipo ir RNR masės kiekio, kuris lieka tam, kad būtų galima gauti tyrimo rezultatą.

13 TYRIMO REZULTATAI

Prosigna tyrimas apima seriją kokybės kontrolės parametrų, kurie yra automatiškai taikomi kiekvienam mėginiui analizės metu. Šie įrašai leidžia įvertinti tyrimo našumą, siekiant nustatyti, ar rezultatai patenka į numatytą verčių ribas. Sėkmingai išanalizavus šiuos kokybės kontrolės parametrus, Prosigna tyrimas pateikia tokius rezultatus:

8 lentelė. Prosigna tyrimo rezultatai ir pateikiamos vertės

Rezultatas	Pateikiamos vertės
Krūties vėžio mėginio vidinis potipis	Luminalinis A Luminalinis B HER2 praturtintas Bazalinio tipo
Nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu individualus tikimybės įvertinimas	0-100 %
Būklės pasikartojimo rizikos (ROR) įvertis	Sveikasis skaičius skalėje nuo 0 iki 100
Rizikos kategorija	Žema, vidutinė, aukšta

13.1 Vidiniai potipiai

Buvo parodyta, kad krūties vėžio naviko vidinis potipis yra susijęs su ankstyvųjų stadijų krūties vėžio prognozėmis. Vidutiniškai, pacientams su luminaliniu A naviku rezultatai yra daug geresni nei pacientams su luminaliniu B, HER2 praturtintu arba bazalinio tipo navikais²⁵.

Vidinis potipis yra nustatomas palyginus 50 genų raiškos profilius nežinomame mėginyje su laukiamais keturių vidinių potipių raiškos profiliiais. Nežinomas mėginis priskiriamas potipis su panašiausiu profiliu.

Dažniausi krūties vėžio potipiai yra luminaliniai – luminalinis A (LumA) ir luminalinis B (LumB). Ankstesniais tyrimais nustatyta, kad luminalinis A potipis sudaro apie 30 % – 40 %, o luminalinis B potipis – apie 20 % krūties vėžio atvejų⁵. Tačiau daugiau nei 90 % hormoniniams receptoriams teigiamų pacienčių turi luminalinius navikus. Šių potipių genų raiškos modelis yra panašus į krūties audinio luminalinio epitelio komponentų raišką⁵. Šiuos navikus charakterizuoja didelės raiškos estrogeno receptorių (ER), progesterono receptorių (PR) ir genai, kurie yra susiję su ER aktyvinimu, pavyzdžiui, LIV1, GATA3 ir ciklino D1, taip pat luminalinių 8 ir 18 citokeratinų raiška. Palyginus su luminalinio B potipio krūties vėžiais, luminalinio A potipio krūties vėžiai demonstruoja mažesnę raišką genų, susijusių su ląstelės ciklo aktyvinimu, o tai lemia geresnę prognozę.

Ankstesniais tyrimais parodyta, kad HER2 praturtintas potipis (HER2-E) sudaro apie 20 % krūties vėžio atvejų⁵. Tačiau HER2 praturtinti navikai dažniausiai yra ER neigiami, todėl tik 5 % iš tirtų ER teigiamų pacienčių populiacijos buvo aptiktas HER2 praturtintas krūties vėžys. Neatsižvelgiant į ER būseną, HER2 praturtinti navikai daugeliu atvejų yra HER2 teigiami ir pasižymi didele ERBB2 klasterio, įskaitant ERBB2 ir GRB7, raišką. Genų, kurie yra susiję su ląstelės ciklo aktyvinimu, raiška taip pat yra didelė.

Remiantis paskelbtais duomenimis, bazalinis potipis apima maždaug 20 % krūties vėžio atvejų⁵. Bazalinio tipo navikai dažniausiai yra ER neigiami, todėl tik 1 % iš hormoniniams receptoriams teigiamų pacienčių turi bazalinio tipo krūties vėžį. Bazalinio tipo potipis beveik visuomet yra kliniškai HER2 neigiamas ir pasižymi įvairių bazalinių biologinių žymenų, įskaitant bazalinius epitelinius citokeratinus (CK) bei epidermio augimo faktoriaus receptorių (EGFR), raišką. Genų, kurie yra susiję su ląstelės ciklo aktyvinimu, raiška yra didelė.

13.2 Būklės pasikartojimo rizikos įvertis

Būklės pasikartojimo rizikos įvertis yra sveikasis skaičius skalėje nuo 0 iki 100, kuris yra susijęs su individualia pacienčių būklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu tikimybe, apibrėžtai tikslinei populiacijai. Būklės pasikartojimo rizikos įvertis yra apskaičiuojamas atlikus nežinomo mėginio 46 genų raiškos profilio palyginimą su laukiamais keturių vidinių potipių raiškos profiliais, kaip aprašyta prieš tai, kad būtų apskaičiuotos keturios skirtingos koreliacijos reikšmės. Tada šios koreliacijos reikšmės bendrai vertinamos su proliferacijos įverčiu ir bendru naviko dydžiu, kad būtų apskaičiuotas būklės pasikartojimo rizikos įvertis.

13.3 Nutolusių būklės pasikartojimų per 10 metų tikimybė

Dviejų kohortų moterų po menopauzės su hormonų receptoriams teigiamu ankstyvosios stadijos krūties vėžiu būklės pasikartojimo rizikos įverčiai buvo palyginti su išgyvenamumu be nutolusių būklės pasikartojimų pacientėms po operacijos ir 5 metų trukmės gydymo taikant adjuvantų endokrininę terapiją, kurios vėliau buvo stebimos 5 metus (išsamesnės informacijos žr. 16.4 skyriuje „Klinikinis našumas“). Šie du tyrimai leido sukurti modelį, susiejantį būklės pasikartojimo rizikos įvertį su nutolusių būklės pasikartojimų tikimybe tirtoje pacienčių populiacijoje, įskaitant 95 % pasikliautinąjį intervalą.

13.4 Rizikos klasifikacija

Rizikos klasifikacija yra taip pat pateikiama tam, kad būtų galima interpretuoti būklės pasikartojimo rizikos įvertį, naudojant ribines vertes, kurios tirtų pacienčių populiacijose yra susijusios su klinikiniais rezultatais.

9 lentelė. Rizikos klasifikacija pagal būklės pasikartojimo rizikos intervalą ir mazgelių būklę.

Mazgelių būklė	Būklės pasikartojimo rizikos intervalas	Rizikos klasifikacija
Mazgeliams neigiama	0–40	Žema
	41–60	Vidutinė
	61–100	Aukšta
Mazgeliams teigiama (1–3 mazgeliai)	0–15	Žema
	16–40	Vidutinė
	41–100	Aukšta
Mazgeliams teigiama (≥ 4 mazgeliai)	0–100	Aukšta

13.5 Kokybės kontrolė

Kiekviena Prosigna tyrimo komponentų partija yra išbandyta taikant iš anksto apibrėžtas charakteristikas. Visi rinkinio lygmens elementai yra atsekami pagal partiją, o kiekvieno rinkinio kritiniai komponentai yra kartu išbandomi drauge ir išleidžiami kaip Prosigna rinkinio partija.

Prosigna tyrimo rinkinyje yra serija vidinių kontrolių, kurios yra naudojamos kiekvieno apdorojamo rinkinio kokybės įvertinimui, kai vertinama visuma ir atskirai kiekvienas mėginys. Šios kontrolės yra išvardytos žemiau.

Partijos kontrolės rinkinys *in vitro* transkribuotas palyginamasis RNR mėginys

Kaip kontrolė NanoString Prosigna tyrimo rinkinyje yra pateiktas Sintetinis palyginamasis RNR mėginys. Palyginamasis mėginys yra sudarytas iš RNR taikinių, kurie *in vitro* transkribuoti iš 50 algoritmo ir 8 bendrinių

(angl. housekeeping) genų. Kiekvieno Prosigna tyrimo metu palyginamasis mėginys apdorojamas dukart drauge su rinkiniu, į kurį įeina iki 10 nežinomų krūties naviko RNR mėginių. Tai atliekama 12 reakcijų juostiniame mėgintuvėlyje. Palyginamojo mėginio signalas yra analizuojamas pagal iš anksto apibrėžtas ribas tam, kad būtų įvertinta tyrimo kokybė.

Signalas, gautas iš visų krūties naviko RNR mėginio 50 algoritmo genų, yra normalizuojamas pagal atitinkamų palyginamojo mėginio genų signalą.

Teigiamų kontrolių rinkinys: *in vitro* transkribuoti RNR taikiniai ir atitinkami fiksavimo bei reporteriniai zondai

Kaip teigiamos Prosigna tyrimo kontrolės (TK), naudojami sintetiniai RNR taikiniai. TK taikinių sekos yra gautos iš išorinio RNR kontrolių konsorciumo (ERCC), DNR sekų bibliotekos⁶. RNR taikiniai yra *in vitro* transkribuojami iš DNR plazmidžių. Drauge su atitinkamais fiksavimo ir reporteriniais zondais tyrimo rinkinyje yra šeši RNR taikiniai, sudarantys 4 laipsnio titravimo seką (128–0,125 fM galutinė koncentracija hibridizacijos reakcijoje). TK pridėjama į kiekvieną krūties naviko RNR mėginį ir palyginamąjį mėginį, kurie tiriami naudojant Prosigna tyrimą. Mėginys bus pašalintas iš tolesnės analizės, jeigu TK signalo intensyvumas neatitiks iš anksto apibrėžtų ribų.

Neigiamų kontrolių rinkinys: egzogeniniai zondai be taikinių

Neigiamų kontrolių taikinių sekos yra gautos iš ERCC DNR sekų bibliotekos⁶. Zondai sukurti taip, kad aptiktų šias taikinio sekas, ir jie yra pateikti kaip tyrimo rinkinio dalis be atitinkamų taikinių sekų. Neigiamos kontrolės (NK), kaip kokybės kontrolės matas, yra pridėamos į kiekvieną krūties naviko RNR mėginį ir palyginamąjį mėginį, kurie tiriami naudojant Prosigna tyrimą. Mėginys bus pašalintas iš tolesnės analizės, jeigu NK signalo intensyvumas neatitiks iš anksto apibrėžtų ribų.

RNR vientisumo kontrolių rinkinys: Bendriniai genai

Fiksavimo ir reporteriniai zondai sukurti taip, kad aptiktų 8 bendrinius genus ir 50 algoritmo genų, ir jie yra pateikiami kaip Prosigna rinkinio dalis. Aštuonių bendrinių genų raiškos lygiai yra analizuojami tam, kad būtų nustatyta iš FFPE audinio išskirtos RNR mėginio kokybė ir kiekis Prosigna tyrime. Mėginys bus pašalintas iš tolesnės analizės, jeigu bendrinių genų raiškos lygiai nepasieks iš anksto apibrėžtų ribų.

Bendriniai genai taip pat naudojami intaktinės RNR kiečio, esančio mėginyje, normalizavimui, kai yra skirtumų prieš atliekant palyginamojo mėginio normalizavimą.

14 PROCEDŪRŲ APRIBOJIMAI

- Prosigna tyrimas buvo optimizuotas, siekiant identifikuoti krūties vėžio naviko vidinį potipį ir pacientės nutolusių būklės pasikartojimų riziką 10 metų laikotarpiu, kaip būklės pasikartojimo rizikos įvertį bei rizikos kategoriją. Tam naudojama išgryninta RNR, kuri išskirta iš formalinu užfiksuoto, parafinu imobilizuoto žmogaus krūties audinio. Kiti mėginių tipai arba fiksatoriai nebuvo tiriami ir neturi būti naudojami.
- Prosigna tyrimo našumas buvo patikrintas naudojant tik šiame informaciniame lapelyje aprašytas procedūras. Modifikavus šias procedūras, gali pasikeisti testo našumą.
- Prosigna tyrimo našumo charakteristikos buvo nustatytos moterims po menopauzės su hormonų receptoriams teigiamu ankstyvosios stadijos krūties vėžiu, kuris buvo gydomas 5 metus taikant adjuvantų endokrininę terapiją. Našumas su kitais gydymo režimais arba kitoms pacienčių populiacijoms nebuvo nustatytas.
- Jeigu atliekant tyrimą buvo pridėta nepakankamos kokybės RNR arba buvo nepakankamas jos kiekis, tada Prosigna tyrimas gali neduoti patikimų rezultatų, o vietoje to bus pranešama apie tyrimo nesėkmę.
- Prosigna tyrimo rezultatai (vidinis potipis, atkičio rizikos įvertis, rizikos kategorijos) turi būti interpretuojami kitų klinikinių-patologinių veiksnių, pacientės medicininės istorijos ir visų kitų laboratorinių tyrimų rezultatų kontekste.
- Prosigna tyrimo našumas buvo nustatytas naudojant RNR, kuri atitinka anksčiau aprašyto metodo charakteristikas. Našumas naudojant išskirtą RNR, kuri neatitinka šių charakteristikų, nebuvo nustatytas.
- Tarp Prosigna tyrimui trukdančių medžiagų patenka genominė DNR ir nenavikinis audinys (pvz., normalus audinys). Prieš pradėdami procedūrą, perskaitykite bendrą tyrimo aprašymą. Prieš pradėdami procedūrą, gyvybingos invazinės karcinomos plotas turi būti aiškiai nustatytas patologo. Be to, kiekvienas RNR mėginys turi būti paveiktas DNaze. Prieš tęsiant darbą su pacienčių testo mėginiais, turi būti iširta kiekviena nauja DNazės partija, kuri turi būti kokybiškai įvertinta taikomų reikalavimų atžvilgiu, je tyrimui naudojamas ne Roche FFPET RNR išskyrimo rinkinys.

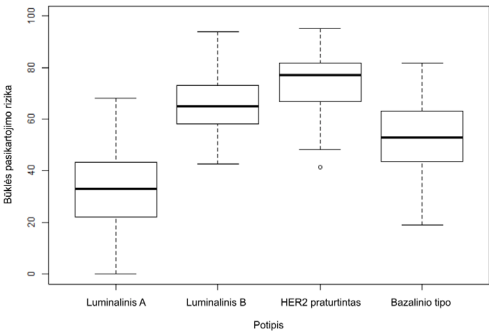
15 LAUKIAMOS VERTĖS

Prosigna tyrimas kiekvienam naviko mėginiui pateikia būklės pasikartojimo rizikos įvertį (0–100), vidinį potipį (luminalinis A, luminalinis B, HER2 praturtintas arba bazalinio tipo) ir rizikos kategoriją (žema, vidutinė arba aukšta). Remiantis toliau aprašytais dviem klinikinio patvirtinimo tyrimais, toliau yra pavaizduotas laukiamas būklės pasikartojimo rizikos įvertių intervalas ir dažnis (10 paveikslas), laukiamas tolydus būklės pasikartojimo rizikos sąryšis su nutolusio būklės pasikartojimo tikimybe pagal mazgelių būklę (11 paveikslas) ir laukiamas būklės pasikartojimo rizikos įvertių pasiskirstymas pagal vidinį potipį (9 paveikslas) moterims po menopauzės su HR+ ankstyvos stadijos krūties vėžiu ir gydytoms anastozolu arba tamoksifenu ATAC bei ABCSG-8 klinikinių tyrimų metu. Remiantis šiais klinikinio patvirtinimo tyrimais, išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu pagal rizikos kategoriją yra parodytas 12 paveiksle (mazgeliams neigiamoms pacientėms) ir 13 paveiksle (mazgeliams teigiamoms (1–3 mazgeliai) pacientėms).

15.1 Būklės pasikartojimo rizikos intervalas pagal potipį

9 paveiksle parodyta būklės pasikartojimo rizikos įvertių pagal vidinį potipį stačiakampių diagrama.

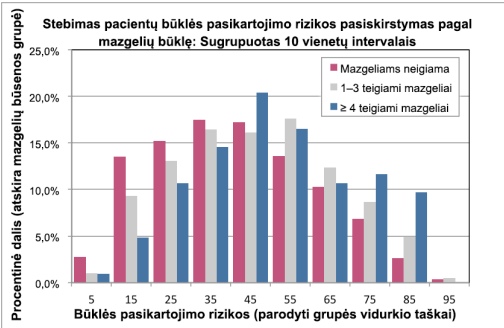
9 paveikslas. Būklės pasikartojimo rizikos įvertių stačiakampių diagrama pagal vidinį potipį.



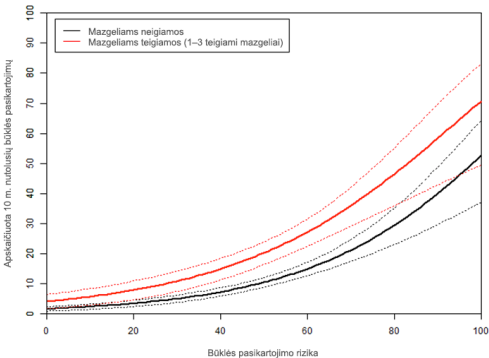
15.2 Būklės pasikartojimo rizikos įvertio dažnis pagal mazgelių būklę

10 paveiksle pateikta histograma buvo sudaryta, naudojant pavienį Cox modelį, kuris apėmė būklės pasikartojimo rizikos įvertio ir kategorijos kintamuosius, siekiant išskirti tris mazgelių apimančias grupes.

10 paveikslas. Būklės pasikartojimo rizikos įvertių ir mazgelių būklės grupių histograma.



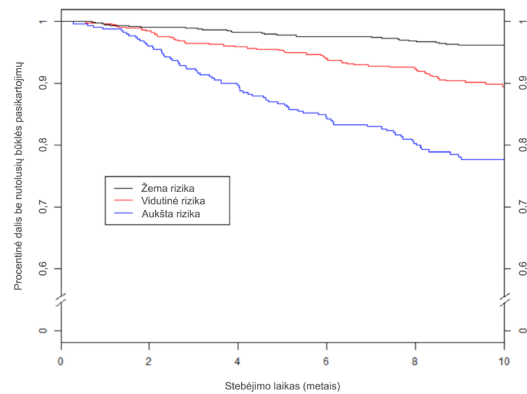
11 paveikslas. Prognozuojama rizika dešimties metų laikotarpiu, apskaičiuota mazgelių būklės grupei.



15.3 Pacienčių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos kategoriją

Toliau pateikti duomenys gauti sujungus TransATAC ir ABCSG-8 klinikinių tyrimų analizes. Siekiant pacientės priskirti rizikos grupėms, būklės pasikartojimo rizikos įvertčiai buvo palyginti su iš anksto apibrėžtomis mazgeliams neigiamų ir mazgeliams teigiamų pacienčių rizikos ribomis. 12 ir 13 paveiksluose kiekvienai rizikos kategorijos grupei parodytas pacienčių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal mazgelių būklę.

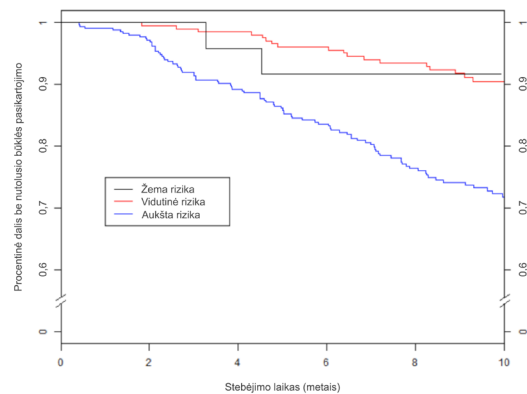
12 paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.



12 paveikslas duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % – 97,3 %]
Vidutinė	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % – 91,7 %]
Aukšta	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % – 81,9 %]
Iš viso	1786 (100 %)	157	

13 paveikslas. Mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę.



13 paveikslas duomenų suvestinė. Mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % – 97,8 %]
Vidutinė	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % – 93,9 %]
Aukšta	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % – 76,6 %]
Iš viso	590 (100 %)	107	

10 lentelė. Pacienčių su 4 arba daugiau teigiamų mazgelių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų dešimties metų laikotarpiu.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis 10 metų be nutolusių būklės pasikartojimų laikotarpiu [95 % PI]
Aukšta	103	39	57,4 % [46,3 % – 67,0 %]

16 NAŠUMO CHARAKTERISTIKOS

16.1 Analizinis tikslumas ir atkuriamumas

Siekiant įvertinti bendrą Prosigna tikslumą ir atkuriamumą, buvo atlikti du tyrimai, o jų rezultatai sujungti. Pirmasis atliktas tyrimas buvo skirtas nCounter Dx analizinės sistemos tikslumui nustatyti, pradedant nuo išskirtos krūties naviko RNR, o antrasis tyrimas buvo atkuriamumo tyrimas, pradedant nuo FFPE krūties navikinio audinio, atsižvelgiant į ikianalizinius veiksnius.

RNR tikslumas

16.1.1 Tyrimo planas

Trijų vietų aklas ir atsitiktinių imčių lyginamasis tyrimas buvo atliktas su Prosigna testu ir naudojant nCounter Dx analizinę sistemą, siekiant įvertinti analizinį tikslumą. Penki jungtiniai krūties naviko RNR mėginiai buvo gauti iš FFPE mėginių archyvo ir naudoti tyrimui kiekvienoje vietoje. Mėginių profilis atstovavo prototipiniams genų raiškos profiliams, su kuriais susiduriama įprastinių tyrimų metu ir kiekvienai riziką klasifikuojančiai grupei.

Kiekvienoje vietoje buvo atlikta po 18 galiojančių procedūrų (kiekvienas naudotojas atliko po 9 procedūras, kiekviena procedūra apėmė 10 testų), o prieš tai kiekvienas naudotojas atliko susipažinimo procedūrą (11 lentelė). Kiekvienos procedūros metu kiekvienas mėginys buvo tiriamas po du kartus, o nominalus pateikiamas RNR lygis vieno tyrimo metu buvo 250 ng. Kiekvienas naudotojas per dieną atliko vieną procedūrą, laikydamasis ilgų tyrimų metodams taikomų standartų⁷. Bendra tyrimo trukmė, įskaitant susipažinimą, kiekvienoje vietoje buvo ilgesnė nei 4 savaitės.

11 lentelė. RNR tikslumo tyrimo apžvalga.

Tyrimo kintamasis	Skaiciai
Krūties navikinių RNR mėginių skaičius	5
Mėginio kartojamų tyrimų (tos pačios kasetės) skaičius procedūros metu	2
Procedūrų skaičius vietoje	18
Procedūrų skaičius per dieną	1
Naudotojų skaičius vietoje	2
Reagentų partijų skaičius vietai	3
Vietų skaičius	3
<i>Bendras vietoje ištirtų mėginių skaičius (be susipažinimo)</i>	<i>180</i>
<i>Bendras mėginių skaičius =</i>	<i>540</i>

16.1.2 Kintamumo komponentų analizė

12 lentelėje pateikti kintamumo komponentų analizės rezultatai kiekvienam profiliui nariui. Toliau pateiktas apskaičiuotas kintamumas yra išreikštas bendro kintamumo procentais (skliausteliuose).

12 lentelė. Kintamumo komponentai pagal profilio narį (jungtinis RNR mėginys).

Profilio narys pagal riziką, potipis	Būklės pasiskirstymas	Kintamumo komponentas					Bendras kintamumas	Bendras SN
		Partija	Vieta	Naudotojas	Procedūra	Procedūros metu		
Žema, luminalinis A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66
Vidutinė, luminalinis B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76
Tarpinė, bazalinio tipo	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55
Aukšta, luminalinis B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76
Aukšta, HER2 praturtintas	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66

Visiems penkiems profilio nariams bendras SN buvo mažesnis negu 1 būklės pasikartojimo rizikos vienetas skalėje nuo 0 iki 100. Visiems profilio nariams didžioji kintamumo dalis atsirado dėl kintamumo procedūros metu (pakartojamumas). Beveik nebuvo kintamumo tarp skirtingų vietų arba naudotojų. Tikimybės santykio testas dėl vietos reikšmingumo pagal profilio narį parodė, kad vietų skirtumai buvo statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$) Kiekvienai partijai būklės pasikartojimo rizikos įverčių vidurkis yra mažesnis nei 1 būklės pasikartojimo rizikos vienetas, išskyrus visus profilio narius, kurie vidutiniškai lemia apie 20 % bendro kintamumo.

16.1.3 Potipio priskyrimo ir rizikos klasifikavimo atitiktis

Visiems profilio nariams buvo gautas 100 % atitikimas tarp potipio rezultato ir profilio nario vidinio potipio. Visiems mėginiams buvo gautas 100 % atitikimas tarp nustatytos ir laukiamos rizikos grupės.

Audinių atkuriamumas

16.1.4 Tyrimo planas

Trijų vietų aklas ir atsitiktinių imčių lyginamasis tyrimas, pakartotinai tiriant krūties navikinio audinio mėginius, paimtus iš to paties FFPE bloko, buvo atliktas su nCounter Dx analizine sistema ir naudojant Prosigna testą. Kaip tyrimo dalis buvo tiriamas neseniai sukauptų 43 FFPE krūties navikinių mėginių rinkinys iš hormonų receptoriams teigiamų krūties vėžio pacienčių su patvirtinta invazine duktaline ir (arba) lobuline karcinoma. Visi audinių mėginiai buvo atgabenti į atitinkamą tyrimo vietą apdorojimui. 43 mėginiai buvo nepriklausomai peržiūrėti trijų atskirų patologų. Kiekvienam dėl patologijų tiriamam audinio mėginiui buvo atliekama tyrimo procedūra, susidedanti iš audinio makrodisekcijos, RNR išskyrimo ir tyrimo naudojant Prosigna testą. Tą kiekvienoje vietoje atliko po vieną naudotoją, kurie vykdė nustatytą tyrimo procedūrą. Iš kiekvieno audinio mėginio išskirta RNR buvo tirama du kartus atskirų tyrimo procedūrų metu. Atliekant šį tyrimą, buvo naudojamos trys RNR išskyrimo rinkinio partijos (po vieną vienai vietai) ir tos pačios partijos tyrimo rinkinio reagentai. RNR išskyrimui buvo naudojamas vienas objektinis stiklėlis, kai pamatuotas naviko paviršiaus plotas buvo $\geq 100 \text{ mm}^2$, ir 3 objektiniai stiklėliai, kai pamatuotas naviko paviršiaus plotas buvo $< 100 \text{ mm}^2$, o mažiausias leidžiamas naviko paviršiaus plotas buvo 4 mm^2 .

16.1.5 Testo santrauka

Kiekvienoje iš trijų vietų įvertintas keturiasdešimt trijų (43) audinių mėginių priskyrimo rodiklis yra pateiktas 13 lentelėje.

13 lentelė. Priskyrimo rodiklis kiekvienoje vietoje

Vieta	Procentinė dalis, kuri davė rezultatą	Atitinka / iš viso
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Keturiasdešimt mėginių davė rezultatus visose tyrimo vietose (vienoje vietoje reikėjo kartoti vieno mėginio RNR išskyrimą), 1 mėginys davė rezultatus 2 vietose, o 2 mėginiai davė rezultatus vienoje vietoje. Šimtas procentų (100%) mėginių, kurie praėjo audinių peržiūros etapą ir atitiko RNR išskyrimo reikalavimus, leido gauti patenkinamus Prosigna tyrimo rezultatus. Keturiomis iš penkių nesėkmingo RNR išskyrimo atvejų pamatuotas naviko paviršiaus plotas buvo $\leq 15 \text{ mm}^2$ ir sudarė mažiau nei 50 mm^2 bendro tyrimui panaudoto audinio ploto.

43 mėginiai apėmė tiek mazgeliams neigiamas, tiek mazgeliams teigiamas pacientes. Apskaičiuoti 43 mėginių tyrimo rezultatai parodė platų būklės pasikartojimo rizikos įverčių intervalą (94 vienetai), visus 4 vidinius potipius ir visas rizikos kategorijas, kai visiems mėginiams taikytos mazgeliams neigiamos ir mazgeliams teigiamos ribinės vertės. Dviejų mėginių rezultatai, kurie gauti vienoje vietoje, buvo pašalinti iš tolimesnės statistinės analizės, nes apie juos nebuvo gauta duomenų iš kitų tyrimų vietų.

16.1.6 Kintamumo komponentų analizė

Statistiškai reikšmingų ($\alpha = 0,05$) skirtumų tarp rizikos kategorijų, naudojant neparametrinį Kruskal-Wallis testą, nebuvo nustatyta, todėl kintamumo komponentų modelis vienu metu tiko visoms rizikos kategorijoms.

14 lentelėje pateikti kintamumo komponentų analizės rezultatai, naudojant visus 41 audinių mėginius.

14 lentelė. Kintamumo komponentai (audinių atkuriamumo tyrimas)

Kintamumo komponentai				Bendras SN
Vieta	Bloko viduje	Likutis	Iš viso	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Vietos komponentas matuoja sisteminį, vietai būdingą kintamumą. „Vidinis bloko“ komponentas matuoja atsitiktinį kintamumą, kuris kinta kaip audinio mėginio peržiūros / apdorojimo funkcija, arba vidinį FFPE bloko kintamumą, o likutinis kintamumas matuoja bendrą kintamumą tarp procedūrų ir procedūros kintamumą naudojant Prosigna tyrimą. Vietos komponentas yra labai mažas, palyginus su atsitiktiniu kintamumu bloke. Tai reiškia, kad vidutinis skirtumas tarp vietų buvo labai mažas ($< 1 \%$ nuo bendro kintamumo). Likutinis kintamumas atitiko lygiavertį kintamumą, išmatuotą RNR tikslumo tyrimo metu, kuris apėmė mažiau mėginių, bet daugiau kartotinių matavimų (0,51 kintamumas, palyginus su RNR tikslumo tyrimo metu nustatytu vidutiniu 0,39 Prosigna reagentų partijos kintamumu vienoje vietoje).

15 lentelėje pateiktas bendras kintamumas, kuris yra audinių apdorojimo kintamumas (šio tyrimo metu nustatyti vietos ir vidinis bloko komponentai, pateikti 14 lentelėje) ir bendro RNR apdorojimo kintamumo, kuris gautas RNR tikslumo tyrimo metu (penkių tirtų profilio narių vidurkiai, pateikti 12 lentelėje), suma. Pirminis testo kintamumo šaltinis (94 % bendro kintamumo) yra ikianaliziniai veiksniai, susiję su audinių apdorojimu. Bendras SN, įskaitant visus kintamumo šaltinius, yra lygus 2,9. Tai reiškia, kad Prosigna tyrimas yra patikimas dviejų būklės pasikartojimo rizikos verčių skirtumo įvertinimas, kuris lygus 6,75 su 95 % pasikliautimumu.

15 lentelė. Bendras kintamumas (audinių ir RNR apdorojimas).

Audinių apdorojimo kintamumas	RNR apdorojimo kintamumas	Bendras kintamumas	Bendras SN
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Rizikos kategorijos ir potipio klasifikacijų atitiktis

Skirtingų vietų atitiktis pagal pacientės potipį ir rizikos klasifikaciją (žema / vidutinė / aukšta rizika) pateikta 16 lentelėje, kurioje atitinkamos mageliams neigiamų ir mazgeliams teigiamų klasifikacijų rizikos ribinės vertės buvo pritaikytos visiems mėginiams. Tikslaus tipo 95 % pasikliautinieji intervalai yra pateikti laužtiniuose skliaustuose, o mėginių skaičius su abiejų vietų rezultatais yra pateiktas skliaustuose. Atitiktis vidurkis pateiktas paskutiniame stulpelyje. Kiekvienam palyginimui atitiktis buvo apskaičiuota dviem veiksmais. Pirmiausia, kiekvienam audinio mėginiui buvo suskaičiuota atitinkančių keturių galimų rezultatų porų (dviejų vietoje*, dviejų 2 vietoje) proporcija. Atliekant antrą veiksmą, buvo apskaičiuoti šių proporcijų vidurkiai visiems audinių mėginiams, kurie duotam palyginimui rezultatus leido gauti abiejose vietose.

16 lentelė. Potipio ir rizikos kategorijos atitiktis pagal mazgelių būklę suvestinė.

Lyginamas tipas	Atitiktis poromis			Atitiktis vidurkis
	1 vieta ir 2 vieta (n = 40)	1 vieta ir 3 vieta (n = 41)	2 vieta ir 3 vieta (n = 40)	
Potipis	96,3 % [86,4 % - 99,5 %]	98,8 % [91,0 % - 100 %]	95 % [83,1 % - 99,3 %]	97 %
Rizikos kategorija Mazgeliams neigiamas	87,5 % [73,2 % - 95,8 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	90 % [76,4 % - 97,2 %]	90 %
Rizikos kategorija mazgeliams teigiamas	88,8 % [75,9 % - 96,0 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	91,3 % [79,2 % - 97,4 %]	91 %

Kiekvienam palyginimui (potipio ir mazgeliams neigiamos bei mazgeliams teigiamos rizikos kategorijų) vidutinė atitiktis tarp skirtingų vietų buvo ne mažesnė nei 90 %. Nebuvo tokių mėginių, kuriems tarp vietų arba vietoje rizikos kategorija pasikeitė nuo žemos rizikos iki aukštos rizikos (arba atvirkščiai). Buvo tik du mėginiai (iš 41), kuriems visų 6 kartotinių tyrimų metu nebuvo nustatyti identiški potipiai:

1. Vienas mėginys parodė pasikartojančius luminalinio A potipio rezultatus vienoje vietoje ir pasikartojančius luminalinio B potipio rezultatus kiekvienoje iš kitų dviejų vietų.
2. Vienas mėginys parodė pasikartojančius luminalinio A potipio rezultatus vienoje vietoje, pasikartojančius HER2 praturtinto potipio rezultatus kitoje vietoje, o trečioje vietoje po vieną luminalinio A potipio ir HER2 praturtinto potipio rezultatus.

16.2 Jautrumas / RNR sąnaudos

RNR sąnaudų tyrimo aprašymas

Tyrimo metu buvo patikrinta 13 krūties navikinių RNR mėginių esant trims RNR sąnaudų lygiams tyrimo charakteristikų ribose (500, 250 ir 125 ng) ir dviem papildomiems RNR sąnaudų lygiams, kurie nepateko į charakteristikų ribas (625, 62,5 ng). Kiekvienas mėginys buvo ištirtas naudojant kiekvienos partijos rinkinį (iš viso 2 partijos) tos pačios tyrimo procedūros metu, kuri apėmė dubliuojamus kiekvieno lygio matavimus charakteristikų ribose ir po vieną matavimą kiekvienam lygiui, kuris nepatenka į charakteristikų ribas. Dubliuojami tušti (t. y. be taikinio) matavimai buvo įtraukti į visas tyrimo procedūras. Vienas mėginys buvo išbandomas tik su viena partija.

RNR sąnaudų tyrimo rezultatai

Visų pamatuotų tuščių mėginių (n = 46) signalai buvo gerokai mažesni nei ribinė vertė ir davė neigiamą testo rezultatą (0 % priskyrimo rodiklis). Visi navikinės RNR matavimai tyrimo charakteristikų ribose (n = 138) davė teigiamą testo rezultatą (100 % priskyrimo rodiklis). Šimtas procentų (100 %) mėginių su sąnaudomis, viršijančiomis charakteristikų ribas (625 ng), davė teigiamus testo rezultatus. Aštuoniasdešimt trys procentai (83 %) tirtų mėginių (10/12), kai RNR kiekis nesiekė charakteristikų ribų (62,5 ng), davė testo rezultatą 1 partijoje ir 100 % mėginių – antroje partijoje.

Trylikos mėginių būklės pasikartojimo rizikos įverčio vidurkis apėmė platų intervalą (20–82). Rizikos grupės klasifikacija (žema / vidutinė / aukšta) 100 %

atitiko visų RNR sąnaudų lygius 13-ai tirtų mėginių. 17 lentelėje apibendrinti būklės pasikartojimo rizikos įverčio kintamumo kaip RNR sąnaudų funkcijos duomenys. Vertinant, ar būklės pasikartojimo rizikos įverčiai, gauti esant skirtingiems RNR sąnaudų lygiams, buvo lygiaverčiai tiems, kurie buvo gauti naudojant 250 ng taikinio lygį, buvo naudojamas būklės pasikartojimo rizikos įverčio skirtumų vidurkis esant skirtingiems RNR sąnaudų lygiams, skirtumų SN ir 90 % pasikliautinis intervalas. Siekiant patenkinti priimtumo kriterijų, visi rezultatai turėjo pateikti į pasikliautinąjį intervalą (-3,3 būklės pasikartojimo rizika). Esant dviem tyrimo charakteristikų intervalo karštų lygiams (125 ng ir 500 ng RNR), būklės pasikartojimo rizikos įverčiai buvo lygiaverčiai tiems, kurių tikslinė sąnaudų koncentracija buvo 250 ng kiekvienai iš tirtų dviejų rinkinio partijų. Kai lygiai nepateko į tyrimo specifikacijų ribas, būklės pasikartojimo rizikos įverčiai buvo lygiaverčiai tik vienai iš dviejų partijų.

17 lentelė. Būklės pasikartojimo rizikos įverčių skirtumų suvestinė. Skaičius yra lygus mėginių, kurie buvo įtraukti į analizę, skaičiui.

Rinkinio partija	Masė (ng)	Skaičius	Būklės pasikartojimo rizikos skirtumų vidurkis	Skirtumų SN	Apatinė pasikliautinio intervalo riba	Viršutinė pasikliautinio intervalo riba
20535	62,5 – 250	10	1,90	2,62	0,54	3,26
	125 – 250	12	0,75	1,23	0,16	1,34
	500 – 250	12	0,04	0,78	-0,33	0,41
	625 – 250	12	-0,13	0,86	-0,53	0,28
20536	62,5 – 250	11	-0,36	3,96	-2,33	1,60
	125 – 250	11	-0,50	3,07	-2,02	1,02
	500 – 250	11	-0,82	3,25	-2,43	0,79
	625 – 250	11	-1,09	4,24	-3,19	1,01

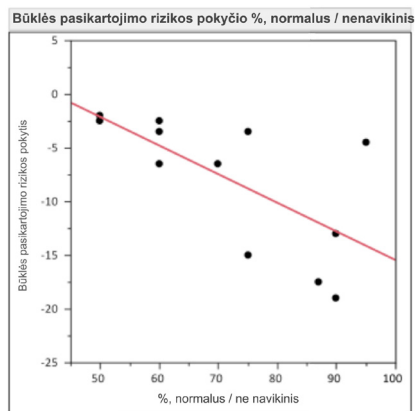
16.3 Interferencijos tyrimas

Greta esantis normalus / nenavikinis audinys

Greta esantis normalus / ne navikinis krūties audinys paprastai būna FFPE krūties naviko blokuose ir gali būti identifikuojamas patologinės apžiūros metu, kaip atskira sritis, besiskirianti nuo invazinės krūties karcinomos srities. Prieš tai pateikta Prosigna tyrimo procedūra aprašo, kaip atliekant makrodisekciją turi būti pašalintas greta esantis normalus audinys. Siekiant įvertinti testo rezultatų užteršimo normaliais audiniais riziką, buvo ištirti iš viso 13 FFPE krūties naviko blokų su patologiškai patvirtinta infiltruojanti duktaline karcinoma ir apie 50–95 % supančio normalaus / nenavikinio audinio, atlikus supančio audinio makrodisekciją ir be jos, o tada buvo nustatytas būklės pasikartojimo įverčio pokytis (delta ROR).

Vidutiniškai būklės pasikartojimo rizika makroskopiškai išskrostiems navikiniams mėginiams beveik 8 būklės pasikartojimo rizikos vienetais viršijo vertes, kurios buvo stebimos, kai normalus / nenavikinis audinys nebuvo pašalintas. 14 paveikslas iliustruoja, kad padidėjus normalaus audinio kiekiui (makrodisekcijos būdu nepašalinta iki 95 %), išauga rizika, kad gautas būklės pasikartojimo rizikos įvertis bus per mažas arba pasižymės neigiamu poslinkiu (iki -19 būklės pasikartojimo rizikos vienetai).

14 paveikslas. Normalaus/ne navikinio audinio įtaka būklės pasikartojimo rizikos pokyčiui.



Nekrozinio, hemoraginio ir DCIS audinio interferencija

Siekiant įvertinti testo rezultatų užteršimo riziką nekroziniams / hemoraginiams / DCIS audiniais, iš viso buvo ištirti 11 FFPE krūties naviko blokų (3 DCIS, 5 nekroziniai, 3 hemoraginiai) su patologiškai patvirtinta invazine krūties karcinoma ir apie 10–30 % interferencijos komponento. Interferencijos

komponentas buvo pašalinamas atliekant makrodisekciją arba paliekamas, o tada buvo nustatomas būklės pasikartojimo rizikos įvertio pokytis. Esant tiriamiems lygiams, procedūroje įtrauktų kraujo / hemoraginių, DCIS ir nekrozinį audinį turėjo nežymią įtaką gautam būklės pasikartojimo rizikos įvertiui (< 6 būklės pasikartojimo rizikos vienetai). Vienuolikos nekrozinį, hemoraginių ir DCIS mėginių po makrodisekcijos ir be jos rizikos kategorijos priskyrimo atitiktis buvo 100 %.

Žmogaus genominė DNR

Prosigna tyrimo procedūra apima žmogaus genominės DNR (gDNR) pašalinimą, taikant skaidymą DNaze I. Siekiant įvertinti testo rezultatų užteršimo gDNR pavojų, buvo ištirta dešimt (10) FFPE krūties naviko blokų su patologiškai patvirtinta infiltruojančia duktaline karcinoma, kai žmogaus genominė DNR buvo / nebuvo pašalinta procedūros metu praleidžiant DNazės etapą. Tirtuose mėginiuose būklės pasikartojimo rizikos įvertio vidurkis buvo 4–5 vienetais mažesnis žemos ir vidutinės rizikos grupėse, kai gDNR buvo pašalinta naudojant DNazę (žr. 18 lentelę). Kai mėginiai, kurie nebuvo paveikti DNaze, DNaze buvo paveikti vėliau (vėlesnis apdorojimas), būklės pasikartojimo rizikos įvertiai atitiko būklės pasikartojimo rizikos įvertius, kurie buvo gauti iš pradžių, pagal protokolą paveikus DNaze. Yra rizika, kad esant gDNR gautas būklės pasikartojimo rizikos įvertis bus per didelis arba pasižymės teigiamu poslinkiu (iki 7 būklės pasikartojimo rizikos vienetų). Be to, mėginiams, kurie nebuvo paveikti DNaze I, apskaičiuotas signalas buvo daug (p < 0,05) mažesnis už signalą, apskaičiuotą mėginiams, kurie buvo paveikti DNaze I, dėl sugerties matavimo, kuris naudotas RNR kiekio nustatymui prieš Prosigna tyrimą, interferencijos.

18 lentelė. Apdorojimo DNaze įtaka navikinių mėginių būklės pasikartojimo įvertiui

Būklės pasikartojimo įvertio kategorija	Tirti FFPE mėginiai	Būklės pasikartojimo rizikos skirtumas su DNaze I - be DNazės I			Būklės pasikartojimo rizikos skirtumas su DNaze I - be DNazės I (po poveikio)		
		Vidurkis	Min.	Maks.	Vidurkis	Min.	Maks.
Žema	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Vidutinė	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Aukšta	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinikinis našumas

Siekiant patvirtinti Prosigna krūties vėžio prognostinį genų žymenų tyrimą, buvo atlikti du klinikiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai. Pagrindinis abiejų tyrimų tikslas buvo patvirtinti paskelbtus pastebėjimus, kad būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikia papildomos prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu. Be to, antrinis abiejų tyrimų tikslas buvo patvirtinti ankstesnius pastebėjimus, kad luminalinio A ir luminalinio B potipių pacientės pasižymi statistiškai reikšmingai besiskiriančiu išgyvenamumu nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu. Kadangi abiejų šių tyrimų atrankos kriterijai ir rezultatai buvo panašūs, dvi duomenų bazės buvo sujungtos ir analizuojamos kartu su perspektyviai apibrėžtu analizės planu, kuris turėjo tuos pačius tikslus, kaip ir atskiri tyrimai.

Sujungta analizė: sudaromos rizikos kreivės, naudojant sujungtus Prosigna analizių rezultatus iš TransATAC ir ABCSG-8 tyrimų

Gydymo ir klinikinių charakteristikų suvestinė, gauta atlikus bendrą analizę, pateikta toliau. Informacijos apie atskiro tyrimo planą ir analizę žr. toliau esančiuose skyriuose, atitinkamai skirtuose 1 ir 2 tyrimams.

Analizė

19 lentelė. Jungtinės 1 ir 2 tyrimų analizės gydymo ir klinikinių charakteristikų suvestinė

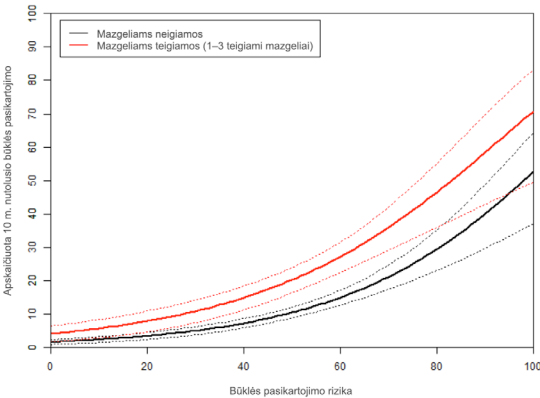
Charakteristika	Vertė	Mazgeliams neigiama (n = 1786)		1–3 teigiami mazgeliai (n = 590)		≥ 4 teigiami mazgeliai (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Gydymas	Anastrozolas	377 (51,0 %)	528 (50,4 %)	102 (49,0 %)	184 (48,2 %)	31 (57,4 %)	25 (51,0 %)
	Tik tamok-sifenas	362 (49,0 %)	519 (49,6 %)	106 (51,0 %)	198 (51,8 %)	23 (42,6 %)	24 (49,0 %)
Laipsnis	G1	169 (22,9 %)	210 (20,1 %)	39 (18,8 %)	54 (14,1 %)	3 (5,6 %)	7 (14,3 %)
	G2/GX	438 (59,3 %)	837 (79,9 %)	122 (58,4 %)	328 (85,9 %)	37 (68,5 %)	42 (85,7 %)
	G3	132 (17,9 %)	0 (0 %)	47 (22,6 %)	0 (0 %)	14 (25,9 %)	0 (0 %)
Naviko dydis	≤ 1 cm	122 (16,5 %)	219 (20,9 %)	13 (6,2 %)	37 (9,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)
	1–2 cm	420 (56,8 %)	568 (54,3 %)	83 (39,9 %)	193 (50,5 %)	15 (27,8 %)	18 (36,7 %)
	2–3 cm	157 (21,2 %)	213 (20,3 %)	77 (37,0 %)	122 (31,9 %)	18 (33,3 %)	23 (46,9 %)
	> 3 cm	40 (5,4 %)	47 (4,5 %)	35 (16,8 %)	30 (7,9 %)	18 (33,3 %)	6 (12,2 %)
HER2 būklė	Neigiama	649 (87,8 %)	984 (94,0 %)	186 (89,4 %)	367 (96,1 %)	47 (87,0 %)	46 (93,9 %)
	Teigiama	90 (12,2 %)	63 (6,0 %)	22 (10,6 %)	15 (3,9 %)	7 (13,0 %)	3 (6,1 %)
Pasikartojimai	Atokūs	79 (10,7 %)	91 (8,7 %)	50 (24,0 %)	64 (16,8 %)	31 (57,4 %)	10 (20,4 %)
	Jokių	117 (15,8 %)	121 (11,6 %)	59 (28,4 %)	73 (19,1 %)	34 (63,0 %)	10 (20,4 %)
NanoString vidiniai potipiai	Luminalinis A	529 (71,6 %)	725 (69,2 %)	127 (61,1 %)	248 (64,9 %)	31 (57,4 %)	31 (63,3 %)
	Luminalinis B	176 (23,8 %)	284 (27,1 %)	68 (32,7 %)	118 (30,9 %)	20 (37 %)	16 (32,7 %)
	Bazalinio tipo	7 (0,9 %)	6 (0,6 %)	2 (1,0 %)	2 (0,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	HER2 praturtintas	27 (3,7 %)	32 (3,1 %)	11 (5,3 %)	14 (3,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)

Abu tyrimai turėjo 5 metų gydymo tamoksifenu grupę. TransATAC tyrimo metu kita grupė buvo 5 metų gydymo anastrozolu grupė, o ABCSG-8 tyrimo antra grupė buvo 2 metų gydymo tamoksifenu ir vėlesnio 3 metų gydymo anastrozolu grupė. Kai nutolęs būklės pasikartojimas buvo sumodeliuotas kaip visų klinikinių ir gydymo kintamųjų funkcija, gydymas, kaip nutolusio būklės pasikartojimo prediktorius, nebuvo reikšmingas (p = 0,66). Kiti pagrindiniai šių klinikinių tyrimų skirtumai buvo faktas, kad TransATAC klinikinis tyrimas apėmė pacientes su 3 laipsnio navikais ir kad bendras būklės pasikartojimo dažnis TransATAC tyrimo metu buvo didesnis nei ABCSG-8 tyrimo metu.

Rezultatai

15 paveiksle pavaizduota nutolusių būklės pasikartojimų rizika 10 metų laikotarpiu kaip būklės pasikartojimo rizikos įvertio funkcija su 95 % pasikliautinaisiais intervalais, remiantis atskirais Cox proporciniais rizikų modeliais kiekviename mazgeliams neigiamų ir mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių grupėje.

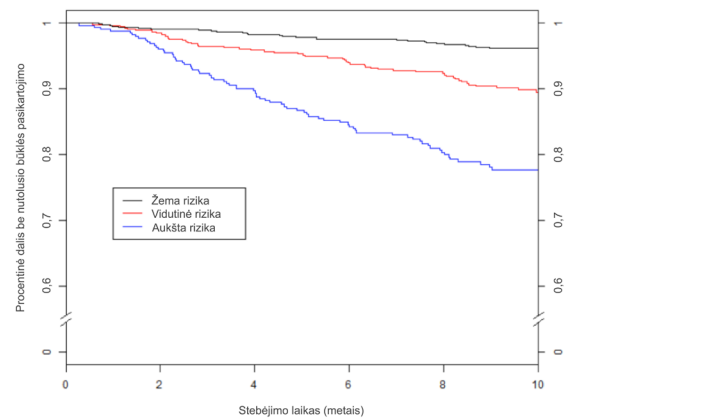
15 paveikslas. Apskaičiuota dešimties metų nutolusių būklės pasikartojimų rizika pagal mazgelių būklę su 95 % pasikliautiniais intervalais.



16 paveiksle pavaizduoti Kaplan-Meier ir atvejų grafikai mazgeliams neigiamų pacienčių rizikos grupei, o 17 paveiksle pavaizduoti tie patys grafikai mazgeliams teigiamoms pacientėms su 1–3 teigiamais mazgeliais. Kiekviename paveiksle

pateikta mėginių dydžių, atvejų skaičiaus ir apskaičiuotos procentinės dalies be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu informacija. Mazgeliams teigiamų pacienčių grupėje tik kelios pacientės pateko į anksto apibrėžtas žemos rizikos grupes, nulemdamos Kaplan-Meier kreivės pasikliautinąjį intervalą. Todėl 10 metų laikotarpio išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų yra labai platus.

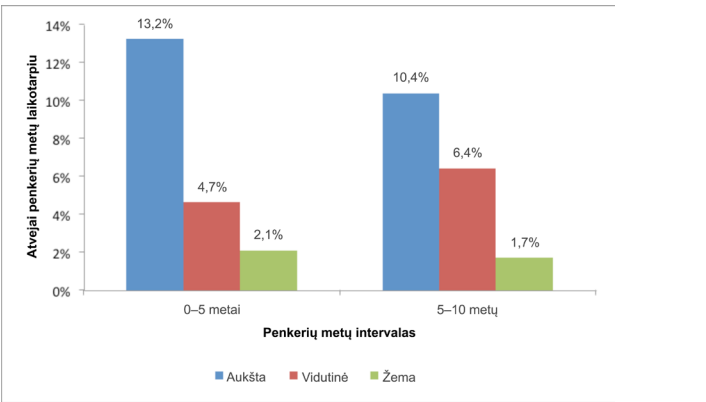
16A paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.



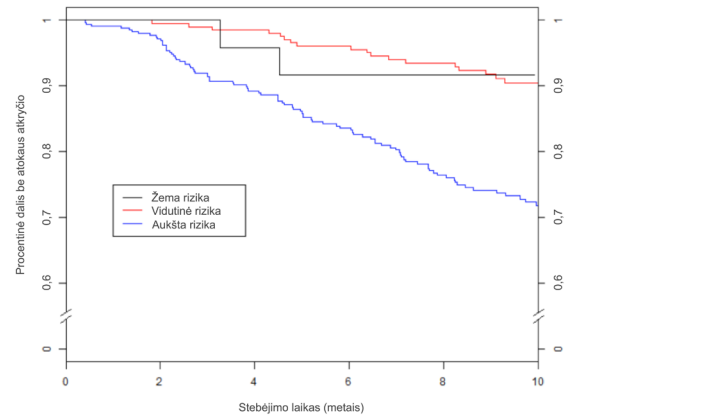
Duomenų suvestinė pagal 16A paveikslą: išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % – 97,3 %]
Vidutinė	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % – 91,7 %]
Aukšta	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % – 81,9 %]
Iš viso	1786 (100 %)	157	

16B paveikslas. Atvejai pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms penkerių metų laikotarpiu.



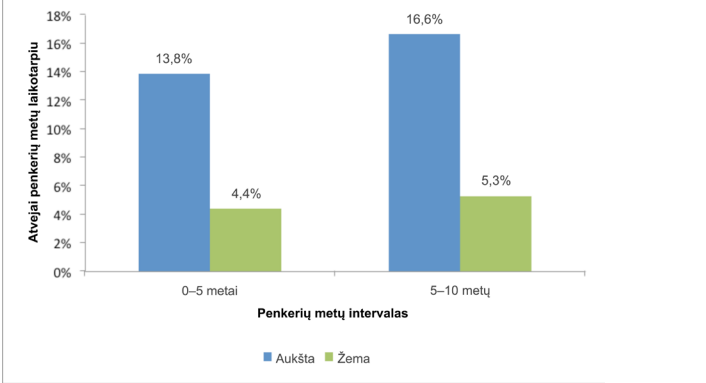
17A paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams teigiamoms pacientėms su 1–3 mazgeliais.



17A paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams teigiamoms pacientėms su 1–3 mazgeliais.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % – 97,8 %]
Vidutinė	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % – 93,9 %]
Aukšta	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % – 76,6 %]
Iš viso	590 (100 %)	107	

17B paveikslas. Atvejai pagal rizikos grupę mazgeliams teigiamoms pacientėms (1–3 mazgeliai) penkerių metų laikotarpiu.



17B paveiksle, kadangi buvo tik 24 pacientės su 2 atvejais žemos rizikos mazgeliams teigiamoje grupėje, šios pacientės vėlyvo būklės pasikartojimo analizei buvo sujungtos su vidutinės rizikos pacientėmis.

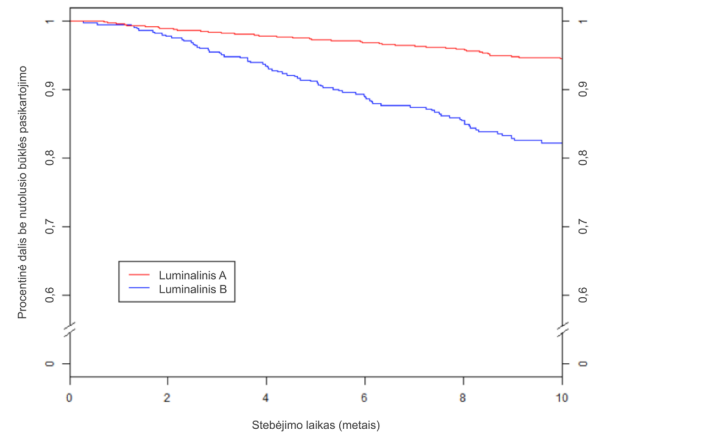
Visos 103 pacientės jungtinėje duomenų bazėje su 4 arba daugiau teigiamų mazgelių buvo klasifikuojamos kaip aukštos rizikos pacientės. 20 lentelėje pateikti išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų dešimties metų laikotarpiu rodikliai šioms pacientėms.

20 lentelė. Pacienčių su 4 arba daugiau teigiamų mazgelių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų dešimties metų laikotarpiu.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Aukšta	103	39	57,4 % [46,3 % – 67,0 %]

Didžioji dalis subjektų jungtiniuose tyrimuose (96 %) buvo luminalinio A arba luminalinio B potipio. 18 paveiksle palygintas mazgeliams neigiamų pacienčių išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal luminalinį potipį.

18 paveikslas. Mazgeliams neigiamų pacienčių išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.

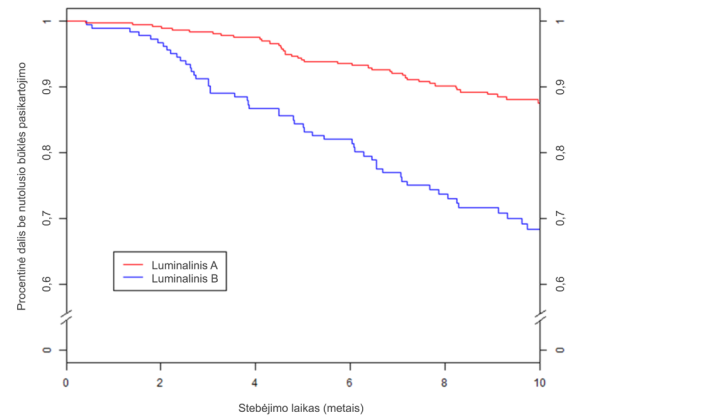


18 paveikslo duomenų suvestinė. Mazgeliams neigiamų pacienčių išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Luminalinis A	1254	62	94,6 [93,1-95,8]
Luminalinis B	460	75	81,9 [77,7-85,3]
Iš viso	1714	137	

19 paveiksle parodytas toks pats palyginimas mazgeliams teigiamoms pacientėms su 1-3 teigiamais mazgeliais. Abiejose grupėse buvo reikšmingų išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų skirtumų tarp luminalinio A ir luminalinio B potipio pacienčių.

19 paveikslas. Mazgeliams teigiamų pacienčių su 1-3 teigiamais mazgeliais išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.



19 paveikslo duomenų suvestinė. Mazgeliams teigiamų pacienčių su 1-3 teigiamais mazgeliais išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Luminalinis A	375	41	87,6 [83,5-90,8]
Luminalinis B	186	52	68,3 [60,4-75,0]
Iš viso	561	93	

Jungtinėje duomenų bazėje buvo tik 98 luminalinio potipio pacientės su 4 arba daugiau mazgeliais. 21 lentelėje pateikti išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai šioms pacientėms, kurios, priklausydamos luminaliniam B potipiui, taip pat pasižymi daug aukštesne rizika.

21 lentelė. Dešimties metų išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai pacientėms su 4 arba daugiau teigiamais mazgeliais pagal luminalinį potipį.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Luminalinis A	62	17	68,3 [53,6-79,3]
Luminalinis B	36	20	38,0 [21,4-54,5]
Iš viso	98	37	

Vėlyvo būklės pasikartojimo analizė

Remiantis anksčiau pateiktais sujungtos analizės duomenimis, kiekvienos rizikos grupės atvejų rodikliai nėra pastovūs dydžiai 10 metų intervale, kaip galima matyti 16B ir 17B paveiksluose. Siekiant labiau suprasti nutolusių būklės pasikartojimų atvejus vėlyvuojų laikotarpiu, pacienčių pogrupiams, kuriems penkerių metų laikotarpiu nebuvo nutolusio būklės pasikartojimo (iš viso 2163 pacienčių⁸), buvo atlikta anksčiau aprašytų sujungtų duomenų aposteriorinė retrospektyvi analizė. Iš jų 1605 buvo mazgeliams neigiamos pacientės, o 488 buvo mazgeliams teigiamos pacientės (1-3 mazgeliai). 20 ir 21 paveiksluose kiekvienos mazgelių grupės vertės, esančios žemiau x ašies ties 5 metais, rodo pacienčių skaičių pagal rizikos grupę penkerių metų laikotarpiu, t. y. jos yra įtraukiamos į vėlyvo būklės pasikartojimo analizę.

22 lentelėje pateikiama mazgeliams neigiamų ir mazgeliams teigiamų (1-3 mazgeliai) pacienčių vėlyvo būklės pasikartojimo analizės gydymo ir klinikinių charakteristikų suvestinė.

22 lentelė. Vėlyvo būklės pasikartojimo analizės gydymo ir klinikinių charakteristikų suvestinė

Charakteristika	Vertė	Mazgeliams neigiama (n = 1605)		Mazgeliams teigiama (1-3 mazgeliai) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Gydymas	Anastrozolas	480	346	153	89
	Tik tamoksifenas	464	315	158	88
Laipsnis	Geras	192	158	46	36
	Vidutinis	752	394	265	105
	Prastas	0	109	0	36
Naviko dydis	≤ 1 cm	204	116	35	11
	1-2 cm	526	376	165	74
	2-3 cm	183	139	90	64
	> 3 cm	31	30	21	28
HER2 būklė	Neigiama	888	590	300	157
	Teigiama	56	71	11	20
Pasikartojimai	Atokūs	41	40	28	29
	Jokių	71	78	37	37
NanoString vidinis potipis	Luminalinis A	674	488	218	112
	Luminalinis B	245	150	87	54
	Bazalinio tipo	4	5	0	1
	HER2 praturtintas	21	18	6	10

Pagrindinis tikslas buvo įvertinti būklės pasikartojimo rizikos įverčio gebėjimą suteikti reikšmingos papildomos prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų laikotarpiu nuo 5 metų iki 10 metų standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu. Naudojant tikimybių santykio (LR) testą, buvo palygintas nulinis modelis, susidedantis vien tik iš klinikinio gydymo įverčio, ir alternatyvus modelis, susidedantis iš klinikinio gydymo įverčio ir būklės pasikartojimo rizikos. Būklės pasikartojimo rizika pridėjo statistškai reikšmingos informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų po 5 metų standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu visoms pacientėms (p < 0,0001), mazgeliams neigiamoms (p < 0,0001) ir mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) pacientėms (p < 0,0001).

23 lentelėje pateikta rizikos santykių 10 punktų pokyčio suvestinė, pagrįsta vienmate analize ir daugiamate analize, kuri apėmė būklės pasikartojimo rizikos įvertį ir klinikinį gydymo įvertį. Net ir po klinikinio gydymo įverčio koregavimo, būklės pasikartojimo rizikos įverčio rizikos santykiai reikšmingai skyrėsi nuo 1. 22 lentelėje taip pat pateikt C rodikliai reikšmingai skyrėsi nuo neinformatyvios 0,5 vertės.

23 lentelė. Vėlyvo būklės pasikartojimo tyrimo suvestinė.

Teigiamų mazgelių skaičius	N	Rizikos santykis: 10 punktų būklės pasikartojimo rizikos įverčio pokytis		C rodiklis su 95 % pasikliautinaisiais intervalais		
		Vienmatė analizė	Daugiamatė analizė	C rodiklis	Apatinė	Viršutinė
0	1605	1,38 [1,23-1,54]	1,29 [1,15-1,46]	70,1 %	64,7 %	75,5 %
1-3	488	1,43 [1,25-1,63]	1,34 [1,16-1,53]	71,1 %	64,0 %	78,3 %

Didžioji dalis pacienčių dviejų tyrimų metu buvo HER2 neigiamos. 24 lentelėje pateiktas HER2 būklės pasiskirstymas mazgeliams neigiamoms ir mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) moterims. Abiejose grupėse virš 90 % tiriamų moterų buvo HER2 neigiamos.

24 lentelė. HER2 būklės pasiskirstymas pagal teigiamų mazgelių skaičių.

Pacienčių potipis	HER2 būklė		Iš viso
	Neigiama	Teigiama	
Mazgeliams neigiamos pacientės	1478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1605
Mazgeliams teigiamos pacientės su 1-3 teigiamais mazgeliais	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

25 lentelėje pateiktas daugiamačio modelio, pritaikyto visoms pacientėms duotoje mazgelių grupėje, palyginimas, kai modelis atitiko visas HER2 neigiamos grupės pacientės. Statistiškai reikšmingų skirtumų nėra.

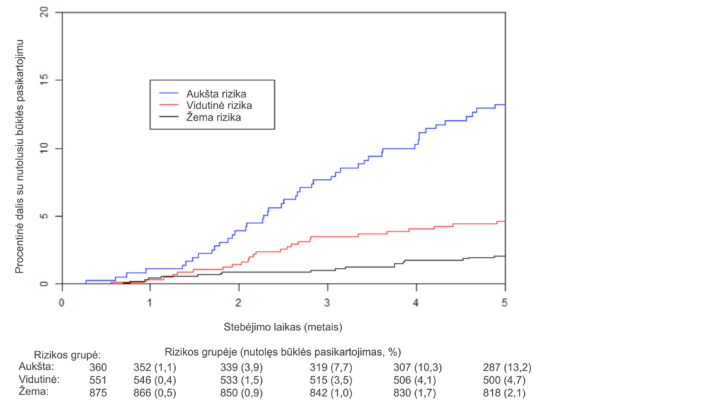
25 lentelė. Daugiamatė rizikos santykiai 10 punktų būklės pasikartojimo rizikos įvertio pokyčiui: visos pacientės pogrupyje ir HER2 neigiamos pacientės pogrupyje

Teigiamų mazgelių skaičius	Visos pacientės [95 % PI]	HER2 neigiamos pacientės [95 % CI]
Mazgeliams neigiamos pacientės	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Mazgeliams teigiamos pacientės su 1-3 teigiamais mazgeliais	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Rizikos grupių palyginimas yra toliau atliekamas 20 ir 21 paveiksluose, kuriuose pateiktos ankstyvo ir vėlyvo nutolusio būklės pasikartojimo atvejų kreivės pagal rizikos grupę atitinkamai mazgeliams neigiamoms ir mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) pacientėms. Atvejų kreivės apima ankstyvą būklės pasikartojimo laikotarpį (per pirmus 5 metus) ir vėlyvą būklės pasikartojimo laikotarpį (tarp 5 ir 10 metų po diagnozės). Iš karto po x ašimi kiekviename paveiksle pateiktas moterų, kurioms gresia pavojus susirgti, skaičius ir bendras atvejų skaičius. Po paveikslais esančiose suvestinėse lentelėse pateikti bendro nutolusių būklės pasikartojimų rodiklio pasiskirstymai intervalai 5 arba 10 metų laikotarpiu moterims, kurioms nutolusio būklės pasikartojimo nebuvo pabaigus 5 metų gydymą. 21 paveiksle pateiktos žemos ir vidutinės rizikos grupės mazgeliams teigiamos (1-3 mazgeliai) pacientės buvo sujungtos, nes žemos rizikos grupėje buvo mažas pacienčių skaičius.

Kaip rodo bendrų atvejų kreivės ir susiję kiekvienos rizikos grupės rizikos santykiai, žemos rizikos populiacija pasižymi maža būklės pasikartojimo tikimybe tarp 5 iki 10 metų po 5 metų endokrininės terapijos. Priešingai, vidutinės ir aukštos rizikos populiacijos pasižymi pastovia vėlyvo nutolusio būklės pasikartojimo rizika po 5 endokrininės terapijos metų. Baigčių skirtumas tarp vidutinės ir aukštos rizikos mazgeliams neigiamų populiacijų nustatytas per pirmuosius 5 metus (nutolusių būklės pasikartojimų rodiklis = 13,2% [9,6 % - 16,7 %] aukštos rizikos ir 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] vidutinės rizikos pacientėms) ir išlieka iki 10 metų, tačiau vidutinės ir aukštos rizikos grupių po 5 endokrininės terapijos metų būklės pasikartojimų rodikliai yra labai panašūs.

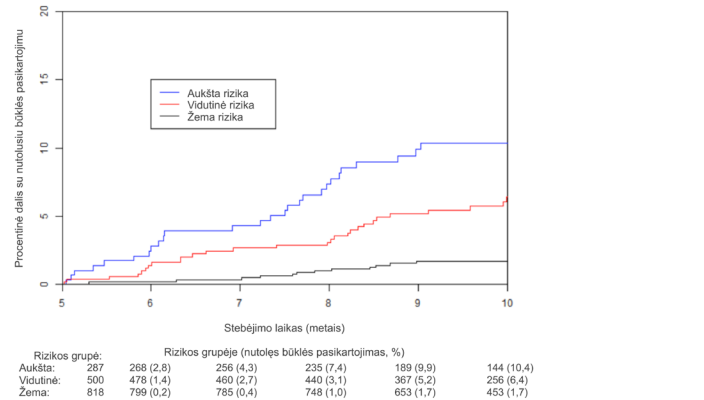
20A paveikslas. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 0 iki 5 metų. Mazgeliams neigiamos pacientės



20A paveikslo duomenų suvestinė. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 0 iki 5 metų. Mazgeliams neigiamos pacientės

Nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai pagal rizikos grupę penkerių metų laikotarpiu užbaigus gydymą [95 % pasisklidimo intervalai]		
Aukšta	Vidutinė	Žema
13,2 % [9,6 % - 16,7 %]	4,7 % [2,9 % - 6,4 %]	2,1 % [1,1 % - 3,1 %]

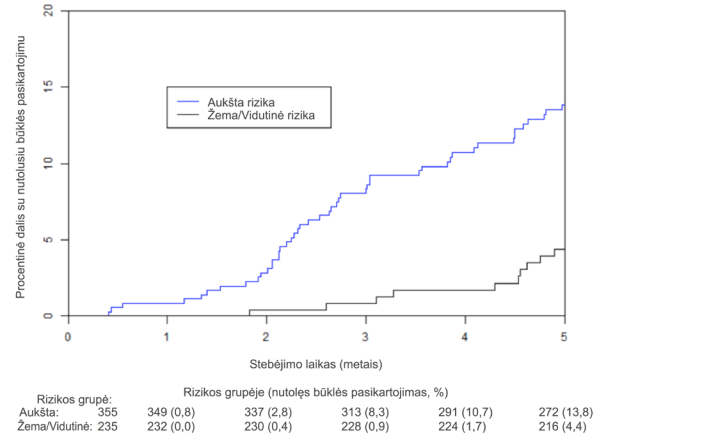
20B paveikslas. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 5 iki 10 metų. Mazgeliams neigiamos pacientės



20B paveikslo duomenų suvestinė. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 5 iki 10 metų. Mazgeliams neigiamos pacientės

Nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai pagal rizikos grupę praėjus penkeriems metams po gydymo užbaigimo be nutolusių būklės pasikartojimų [95 % pasisklidimo intervalai]		
Aukšta	Vidutinė	Žema
10,4% [6,6 % - 14 %]	6,4% [4,1 % - 8,7 %]	1,7% [0,8 % - 2,6 %]

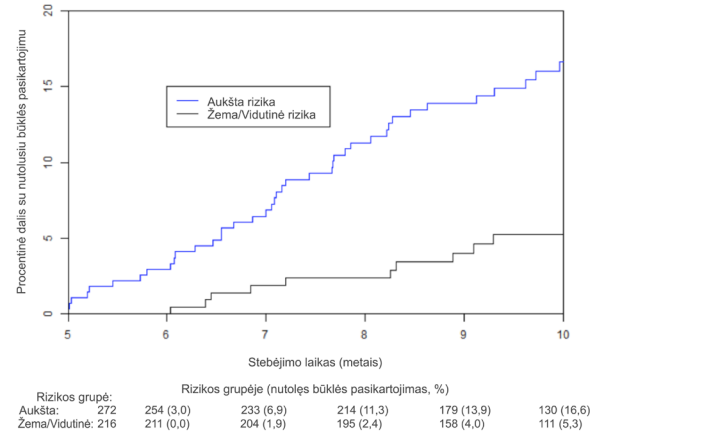
21A paveikslas. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 0 iki 5 metų. Mazgeliams teigiamos (1-3 mazgeliai) pacientės



21A paveikslo duomenų suvestinė. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 0 iki 5 metų. Mazgeliams teigiamos (1-3 mazgeliai) pacientės

Nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai pagal rizikos grupę penkerių metų laikotarpiu užbaigus gydymą [95 % pasisklidimo intervalai]	
Aukšta	Žema / vidutinė
13,8 % [10,1 % - 17,4 %]	4,4 % [1,7 % - 7,0 %]

21B paveikslas. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 5 iki 10 metų. Mazgeliams teigiamos (1-3 mazgeliai) pacientės



21B paveikslo duomenų suvestinė. Nutolusių būklės pasikartojimų atvejų kreivės pagal rizikos grupę nuo 5 iki 10 metų. Mazgeliams teigiamos (1-3 mazgeliai) pacientės

Nutolusių būklės pasikartojimų rodikliai pagal rizikos grupę praėjus penkeriems metams po gydymo užbaigimo be nutolusių būklės pasikartojimų [95 % pasisklidimo intervalai]	
Aukšta	Žema / vidutinė
16,6 % [11,7 % - 21,3 %]	5,3 % [2,0 % - 8,4 %]

Jungtinės analizės išvados

Buvo parodyta, kad būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikia reikšmingos prognostinės informacijos vėlyvo būklės pasikartojimo laikotarpiu tarp 5 ir 10 metų po diagnozės standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu jungtiniame tyrime pacientėms be nutolusių būklės pasikartojimų penkerių metų laikotarpiu. Naudojant rizikos grupes, kurios konkretaus mazgelių skaičiaus kohortai buvo apibrėžtos pagal pradinį lygį, parodyta, kad rizikos grupės visą pacienčių rinkinį klasifikuoja į grupes su reikšmingai skirtinga vėlyvo būklės pasikartojimo rizika. Tiek nuolatinės, tiek būklės pasikartojimo rizikos įvertiais paremtos rizikos grupių analizės parodė panašią prognostinę informaciją įvairiuose pogrupiuose. HER2 neigiamas pacientės palyginus su visomis pacientėmis, medžiagos skirtumų tarp rezultatų nebuvo pastebėta.

Kiekvieno iš TransATAC ir ABCSG-8 tyrimų metu buvo parodyta, kad būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikia reikšmingos prognostinės informacijos standartinių klinikinių ir gydymo kintamųjų atžvilgiu, kai šis įvertis buvo įtrauktas kaip tolydus matas, o taip pat įtrauktas naudojant tris iš anksto apibrėžtas rizikos grupes. Du tyrimai turėjo skirtingus rizikos profilius tuo atžvilgiu, kad atvejų dažnis TransATAC tyrimo metu buvo didesnis nei ABCSG-8 tyrimo metu. Tai akivaizdu palyginus išgyvenamumą be lokalaus būklės pasikartojimo (%) kontrolinėse ATAC (90,8 %) ir ABCSG8 (92,5 %) grupėse, kuris aprašytas literatūroje^{9,10}. Ši analizė sujungė duomenis iš dviejų tyrimų, jiems suteikiant tą patį svorį, kad būtų sugeneruoti rizikos profiliai, kurie būtų labiau apibendrinti kitoms pacienčių populiacijoms nei atskirų tyrimų rezultatai.

1 tyrimas. Nutulusių būklės pasikartojimų rizikos prognozavimas moterims po menopauzės su mazgeliais neigiamu ar mazgeliais teigiamu, hormonų receptoriams teigiamu ankstyvosios stadijos krūties vėžiu, kuris gydytas naudojant arimideksą arba tamoksifeną: TransATAC tyrimas

Tyrimo planas

Klinikinio patvirtinimo tyrimas buvo suplanuotas siekiant patikrinti, ar būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikia papildomos prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu, naudojant visus prieinamus pacienčių mėginius. Šiam tyrimui buvo naudota RNR, išskirta iš FFPE krūties navikinio audinio, gauto iš pacienčių, kurios dalyvavo ATAC klinikiniame tyrime, poaibio¹¹. ATAC klinikinis tyrimas apėmė 9366 pacientės trijose klinikinių tyrimo grupėse (1:1:1), kuriose pacientės atsitiktinai buvo parinkta 5 metų endokrininė terapija, skiriant 1 mg anastrozolo (t. y. arimideksą) ir tamoksifeno placebo, 20 mg tamoksifeno ir anastrozolo placebo arba tamoksifeno / arimidekso derinį. Po pirminės analizės grupės gydymas taikant derinį, nes jis nepasižymėjo efektyvumu arba toleravimo pranašumais, palyginus su vienu tamoksifenu. Neseniai paskelbti 10 metų ATAC klinikinio tyrimo monoterapijos grupių medianos stebėjimai atitiko FDA reikalavimus dėl atnaujintos saugos ir efektyvumo informacijos⁹. Šios analizės metu hormonų receptoriams teigiamoms pacientėms, kurios gydytos anastrozolu, nustatytas reikšmingas išgyvenamumo be ligos (HR = 0,86), išgyvenamumo be būklės pasikartojimo (HR = 0,79) ir išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų (HR = 0,85) pagerėjimas, palyginus tamoksifenu gydytomis moterimis. Išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų absoliutūs skirtumai tarp anastrozolo ir tamoksifeno laikui bėgant išaugo nuo 2,7 % penkerių metų laikotarpiu iki 4,3 % dešimties metų laikotarpiu. TransATAC projektas buvo pradėtas 2002 m. pagal TA/01 protokolą, siekiant sukurti audinių banką iš archyvinų histopatologijos FFPE blokų, atitinkamai gautų iš ATAC pacienčių¹¹.

Iš viso iš 4160 moterų su hormonų receptoriams teigiamu krūties vėžiu, kurios ATAC klinikinio tyrimo metu buvo atsitiktinai suskirstytos į monoterapijos grupes, buvo gauti 2006 blokai. Iš šių FFPE blokų 1372 buvo paimti iš pacienčių Jungtinėje Karalystėje ir jų sudėtyje buvo analizei naudojant Genomic Health® Oncotype Dx® testą pakankamas invazinio naviko kiekis¹². Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) įvertis buvo nustatytas iš FFPE blokų, o tyrimo rezultatai kliniškai patvirtino RS, skirtą įvertinti išgyvenamumui be nutolusių būklės pasikartojimų HR+ krūties vėžio pacientėms po menopauzės, kurios gydytos anastrozolu ir tamoksifenu. Po Oncotype Dx tyrimo likusi RNR buvo nugabenta į Karališkąją Marsden ligoninę Londone, kur buvo saugoma -70 °C temperatūroje. Iš viso 1017 pacienčių iš Oncotype Dx tyrimo liko > 500 ng RNR, kuri buvo ištirta su NanoString, kaip NanoString klinikinio patvirtinimo tyrimo dalis.

Šiam tyrimui naudoti vidiniai potipiai, kurie gauti atlikus analizę, ir vadovaujantis iš anksto nustatytu, nuosekliu analizės planu buvo įvertintos dvi būklės pasikartojimo rizikos įverčių versijos. Du skirtingi būklės pasikartojimo rizikos įverčiai, kurių intervalas yra nuo 0 iki 100, buvo apskaičiuoti naudojant visus 50 tiriamųjų genų, kaip aprašyta ankstesnėse publikacijose², arba 46 genų poaibį. Kiekvienam atveju koeficientai buvo apskaičiuoti naudojant Cox modelį, kuris apima 50 arba 46 genų, naudotų vidinio potipio apskaičiavimui, Pearson koreliaciją, proliferacijos įvertį ir bendrą naviko dydį. Visos analizės buvo atliktos naudojant 10 metų stebėjimo duomenis.

Pagrindinis rodiklis buvo išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų. Jis apibrėžiamas kaip intervalas nuo diagnozės iki nutolusio būklės pasikartojimo arba mirties nuo krūties vėžio. Antrinis rodiklis buvo išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo. Jis apibrėžiamas kaip intervalas nuo diagnozės iki pirmo būklės pasikartojimo (lokalus, regioninis arba nutolusio) arba mirties nuo krūties vėžio.

Siekiant nustatyti pagrindinį rodiklį nuosekliai atliekant 50 ir 46 genų būklės pasikartojimo rizikos testus, buvo pritaikytas daugiamatis Cox proporcinės rizikos modelis, kuriam naudojami visi prieinami pacienčių mėginiai. Modelis apėmė standartinius klinikinius kintamuosius (amžių, naviko laipsnį, naviko dydį, mazgelių būklę, adjuvantinį gydymą). Tada, pritaikius Cox modelį ir tikimybės santykio testą, buvo patikrinta, ar būklės pasikartojimo rizika statistiškai reikšmingai ($\alpha = 0,05$) papildė prognostinę informaciją, palyginus

su klinikiniu gydymo įverčiu. Klinikinis gydymo įvertis yra klinikinių pataloginių veiksnių, optimizuotas derinys, kurį klinikiniai tyrėjai sukūrė kaip standartinės patologijos matą¹². Pirminės analizės buvo kartojamos skirtingiems pacienčių poaibiams (visoms, mazgeliais neigiamoms, mazgeliais teigiamoms arba tik HER2 neigiamoms) ir rodikliams (išgyvenamumui be būklės pasikartojimo arba išgyvenamumui be būklės pasikartojimo).

Kiekvienai mazgeliais neigiamai ir mazgeliais teigiamai pacientei buvo naudojami Cox modeliai (be klinikinio gydymo įverčio), kuriais buvo siekiama prognozuoti 10 metų aokaus būklės pasikartojimo riziką kaip nutolusių būklės pasikartojimų rizikos funkciją. Remiantis šių modelių prognozėmis, rizikos grupės buvo apibrėžtos taip:

Žema rizika:	< 10 % nutolusių būklės pasikartojimų rizika 10 metų laikotarpiu
Vidutinė rizika:	10 % – 20 % nutolusių būklės pasikartojimų rizika 10 metų laikotarpiu
Aukšta rizika:	> 20 % nutolusių būklės pasikartojimų rizika 10 metų laikotarpiu

Analizė

Kiekvienai rizikos grupei buvo sugeneruoti Kaplan-Meier grafikai. Kaip aprašyta pirminėje analizėje, Genomic Health Oncotype Dx testui (RS, būklės pasikartojimo įvertis) ir svarbiausiam tyrėjo imunohistochemija (IHC4) paremtam testui buvo atlikti tikimybės santykio testai (naudojami dviejų statistinių modelių tinkamumo palyginimui). Šie rezultatai buvo palyginti su gautais būklės pasikartojimo rizikai, siekiant įvertinti kiekvienos vertinimo sistemos teikiamos papildomos prognostinės informacijos apimtį klinikinio gydymo įverčio atžvilgiu. IHC4 rezultatai nebus toliau aptariami, nes juos sunku palyginti su kitais tyrimais. Taip yra todėl, kad IHC4 tyrimas buvo mokomas naudojant TransATAC tyrimo duomenis.

26 lentelė. Demografinių ir klinikinių charakteristikų suvestinė.

Charakteristika	Šis tyrimas (n = 1007)		Pirminis tyrimas, iš kurio gauta RNR (n = 1231)	ATAC vieno agento grupės neįtrauktos (n = 2929)
	Pacienčių sk.	Pacientės, %		
Mazgelių būklė				
Neigiama	701	70 %	71 %	68 %
Teigiama	268	27 %	25 %	25 %
Nežinoma	38	4 %	4 %	7 %
Naviko dydis				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1–2 cm	523	52 %		
2–3 cm	253	25 %	33 %	30 %
> 3 cm	93	9 %		
Naviko laipsnis				
Geras	213	21 %	27 %	25 %
Vidutinis	601	60 %	57 %	59 %
Prastas	193	19 %	16 %	17 %
Amžius				
Vidurkis	64,4 metai		64,3	66,1

27 lentelė. Papildomos klinikinės charakteristikos

Charakteristika	Pacienčių skaičius	Pacientės, %
Potipis		
Bazalinio tipo	9	1 %
HER2 praturtintas	41	4 %
Luminalinis A	692	69 %
Luminalinis B	265	26 %
Gydymas		
Anastrozolas	513	51 %
Tamoksifenas	494	49 %
Pasikartojimai		
Jokių	210	21 %
Atokūs	160	16 %
HER2 būklė		
Neigiama	888	88 %
Teigiama	119	12 %

Rezultatai

Pirminės analizės testavimas parodė, kad būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikia papildomos prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų standartinių klinikinių kintamųjų (klinikinio gydymo įverčio) atžvilgiu. Visi pateikti būklės pasikartojimo rizikos duomenys yra paremti 46 genais, kurie yra būklės pasikartojimo rizikos pagrindas, kaip nurodyta Prosigna tyrime.

28 lentelė. Būklės pasikartojimo rizikos pirminės analizės testavimas

Nulinis modelis	Kintamas modelis	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p reikšmė
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

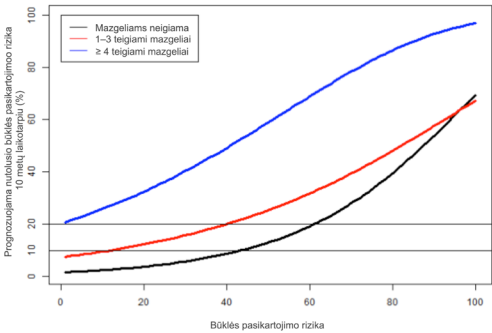
Antrinė analizė parodė, kad būklės pasikartojimo rizika yra reikšmingai susijusi su išgyvenamumu be nutolusio būklės pasikartojimo ir daugeliui kliniškai susijusių pogrupių teikia papildomos prognostinės informacijos klinikinio gydymo įvertio atžvilgiu.

29 lentelė. Pirminės analizės testavimo kartojimas iš anksto nustatytiems pogrupiams

Subjektų grupė	Rodiklis	Pacienčių sk.	Atvejų sk.	CTS+ROR ir CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p reikšmė
Visos	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2 neigiamos	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Mazgeliamis neigiamos	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Mazgeliamis teigiamos	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2 neigiamos, mazgeliamis neigiamos	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

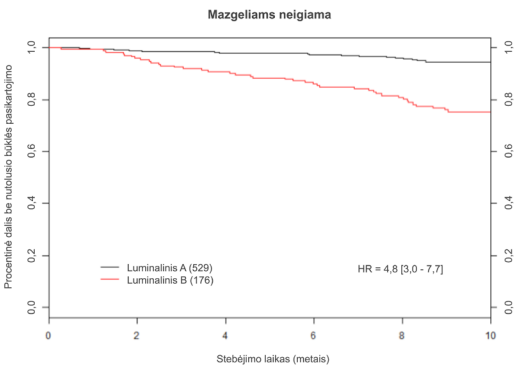
Pirminė ir antrinė analizė parodė, kad būklės pasikartojimo rizika buvo susijusi su išgyvenamumu be nutolusio būklės pasikartojimo visoms pacientėms visuose pogrupiuose.

22 paveikslas. Nutolusių būklės pasikartojimų rizikos prognozė dešimties metų laikotarpiu pagal mazgelių būklės grupės būklės pasikartojimo rizikos įvertio analizę.

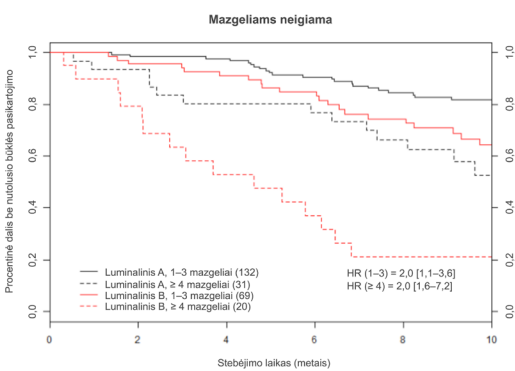


Antrinė analizė parodė, kad luminaliniame A ir luminaliniame B potipiuose rezultatai statistiškai reikšmingai skyrėsi kiekviename pacienčių pogrupyje pagal mazgelių būklę.

23 paveikslas. Išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų Kaplan-Meier kreivės mazgeliamis neigiamoms pacientėms pagal vidinį potipį.

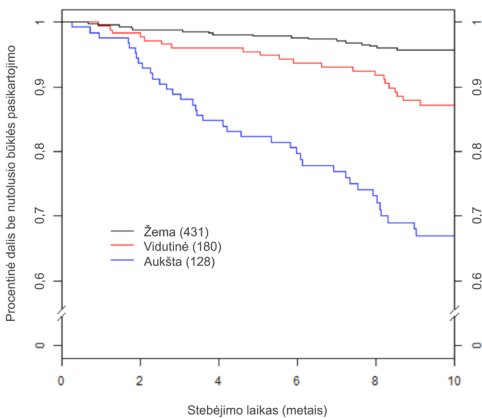


24 paveikslas. Išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų Kaplan-Meier kreivės mazgeliamis teigiamoms pacientėms pagal vidinį potipį.



25 ir 26 paveiksluose pavaizduota, kad kiekvienoje mazgelių kategorijoje absoliuti klinikinė rizika tarp prognozuojamos žemos rizikos ir aukštos rizikos pacienčių reikšmingai skyrėsi: prognozuojamos žemos rizikos pacienčių nutolusio būklės pasikartojimo 10 laikotarpiu rodikliai buvo mažesni nei 10 %, o prognozuojamos aukštos rizikos pacienčių nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu rodikliai buvo didesni nei 30 %.

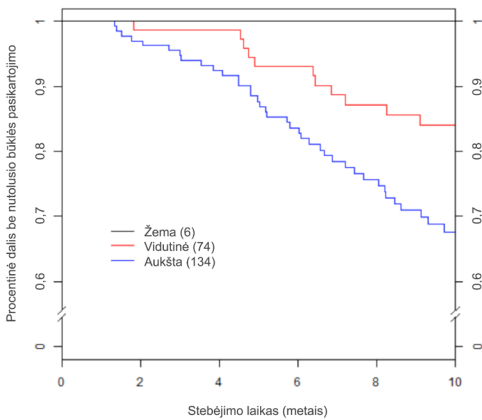
25 paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal neigiamų mazgelių pacienčių rizikos grupes, neįtraukiant klinikinio gydymo įvertio.



25 paveikslo duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal neigiamų mazgelių pacienčių rizikos grupes, neįtraukiant klinikinio gydymo įvertio.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	431 (58 %)	17	96 % [94 % - 98 %]
Vidutinė	180 (24 %)	22	86 % [81 % - 92 %]
Aukšta	128 (17 %)	38	67 % [59 % - 76 %]
Iš viso	739 (100 %)	77	

26 paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę pacientėms su 1-3 teigiamais mazgeliais, neįtraukiant klinikinio gydymo įvertio.



26 paveikslo duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę pacientėms su 1–3 teigiamais mazgeliais, neįtraukiant klinikinio gydymo įvertį.

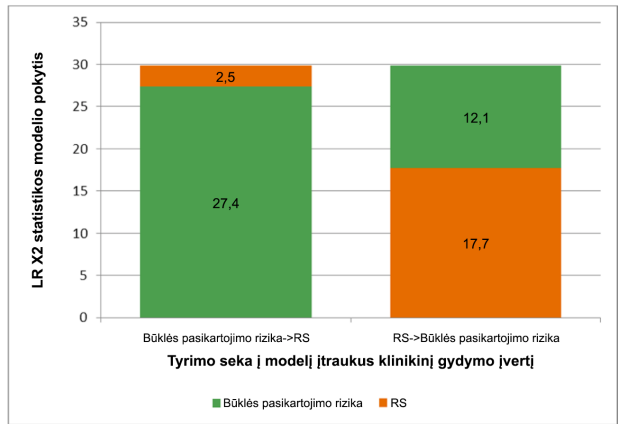
Rizikos grupė	Pacientų skaičius (%)	Atvejų skaičius	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	6 (3 %)	0	100 % [Nėra]
Vidutinė	74 (35 %)	11	84 % [76 % - 93 %]
Aukšta	134 (63 %)	38	68 % [59 % - 77 %]
Iš viso	214 (100 %)	49	

Būklės pasikartojimo rizikos palyginimas su RS

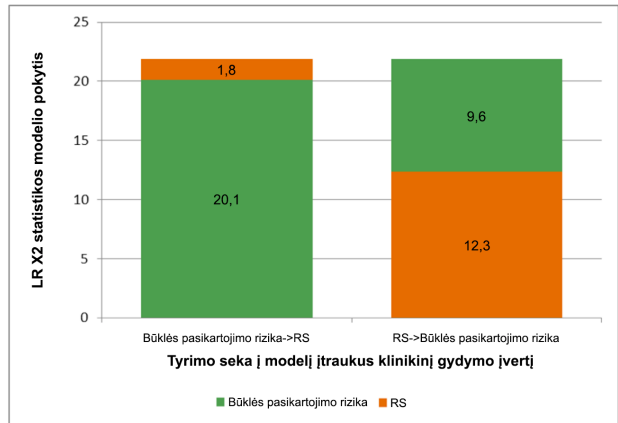
Visiems būklės pasikartojimo rizikos įvertį turintiems 1007 mėginiams buvo prieinami Oncotype Dx testo rezultatai, tačiau IHC rezultatai buvo prieinami tik 940 mėginiams. Tam, kad būtų galima palyginti visus tris testus, šio skyriaus rezultatai remiasi 940 mėginių, kuriems prieinami visų trijų metodų rezultatai (tačiau čia nepateikti IHC4 rezultatai). Papildomam kintamajam yra naudojami tikimybės santykio testai, todėl kad papildoma informacija būtų statistiškai reikšminga ($\alpha = 0.05$), 1 laisvės laipsnio χ^2 statistika turi būti didesnė nei 3,84. Toliau esančiuose paveikluose parodyta papildoma informacija, kai vienas prognostinis testas yra pridedamas prie kito prognostinio testo kartu su klinikiniu gydymo įverčiu. Kiekvieną kartą pridėjus, papildoma informacija matuojama χ^2 pokyčiu.

Būklės pasikartojimo rizika, pridėta prie RS ir papildanti klinikinį gydymo įvertį: prognostinė informacija

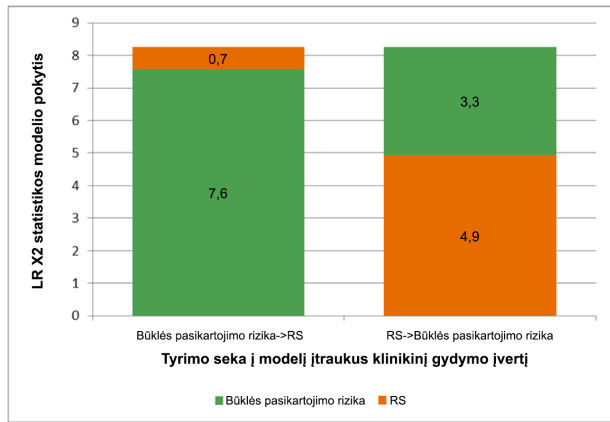
27 paveikslas. Visų pacientų (n = 940) išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų prognostinė informacija, papildanti klinikinį gydymo įvertį.



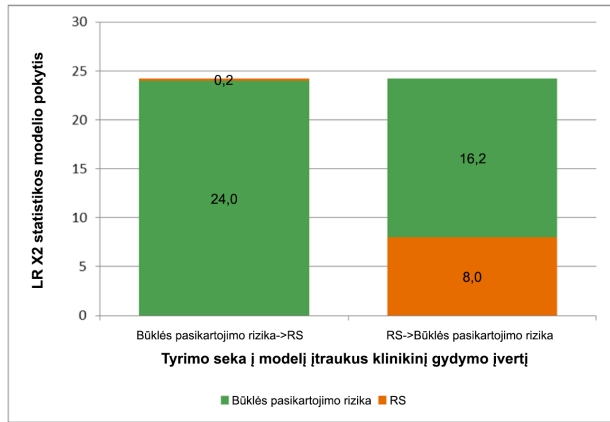
28 paveikslas. Mazgeliams neigiamų pacientų (n = 683) išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų prognostinė informacija, papildanti klinikinį gydymo įvertį.



29 paveikslas. Mazgeliams teigiamų pacientų (n = 257) išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų prognostinė informacija, papildanti klinikinį gydymo įvertį.



30 paveikslas. Mazgeliams neigiamų, HER2 neigiamų pacientų (n = 649) išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų informacija, papildanti klinikinį gydymo įvertį.



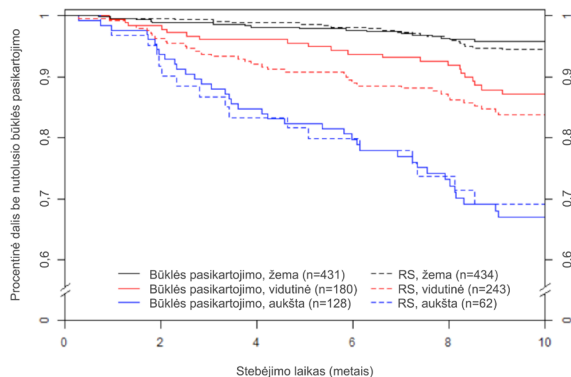
27–30 paveikluose pavaizduota klinikinį gydymo įvertį papildanti informacija, kai iš eilės pridedami du prognostiniai testai. Kiekvieną kartą pridėdant, papildoma informacija yra matuojama kaip χ^2 statistikos pokytis. Pavyzdžiui, kai būklės pasikartojimo rizika buvo pirmas testas, pridėtas įtrauktus klinikinį gydymo įvertį (visų pacientų duomenų), χ^2 statistikos pokytis buvo 27,4. Prie modelio su klinikiniu gydymo įverčiu ir būklės pasikartojimo rizika pridėjus RS, gautas 2,5 χ^2 statistikos pokytis, kuris yra nereikšmingas (kritinė χ^2 testo su 1 laisvės laipsniu vertė yra 3,84). Tai reiškia, kad klinikiniam gydymo įverčiui ir būklės pasikartojimo rizikai esant modelyje, RS neprideda reikšmingas informacijos. Tačiau jeigu pirmasis prie modelio pridėtas testas buvo RS, Būklės pasikartojimo rizika vis tiek apėmė informacijos, kurios neteikė klinikinio gydymo įverčio ir RS derinys. Pridėjus prie mazgeliams teigiamų pacientų klinikinio gydymo įverčio, abu testai rodo prognostinį reikšmingumą, tačiau nei vienas testas nerodo reikšmingumo kaip antras pridėtas testas. Tikriausiai taip yra dėl mažesnės imties. Mazgeliams neigiamų ir HER2 neigiamų pacientų poaibyje RS neprideda reikšmingos prognostinės informacijos prie klinikinio gydymo įverčio ir būklės pasikartojimo rizikos derinio. Kita vertus, būklės pasikartojimo rizika prideda reikšmingos informacijos prie klinikinio gydymo įverčio ir RS derinio.

Būklės pasikartojimo rizika ir RS: baigtys pagal rizikos grupes

Norint palyginti, kaip du testai atskyrė pacientes pagal riziką, TransATAC populiacijoje buvo apibrėžtos rizikos grupės pagal kiekvieno testo įvertintą nutolusių būklės pasikartojimų riziką 10 metų laikotarpiu. Nustatant rizikos grupes ir remiantis mūsų TransATAC tyrimo rezultatais, kiekvienam testui buvo parinktos rizikos įverčio ribinės reikšmės, kurios apibrėžia rizikos grupes, kad būtų apibrėžtos vienoda rizika pasižyminčių pacientų grupės. Siekiant gauti palyginamas rizikos grupes, Oncotype Dx naudotos ribos buvo kitokios nei Genomic Health naudotos ribos. Kiekvienam testui žemos rizikos grupė buvo perspektyviai apibrėžta kaip pacientės, kurių apskaičiuota būklės pasikartojimo rizika yra mažesnė nei 10 %. Kiekvienam testui vidutinės rizikos grupė buvo perspektyviai apibrėžta kaip pacientės, kurių apskaičiuota būklės pasikartojimo rizika patenka į intervalą nuo 10 % iki 20 %. Kiekvienam testui aukštos rizikos grupė buvo perspektyviai apibrėžta kaip pacientės, kurių apskaičiuota būklės pasikartojimo rizika yra didesnė nei 20 %. Toliau pateiktas paveikslas apibendrina kiekvieno testo apibrėžtų rizikos grupių dydžius ir baigtis.

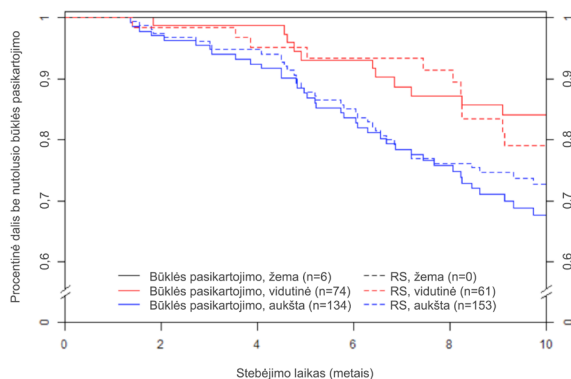
31 paveiksle iliustruojama, kad Prosigna vidutinės rizikos grupės priskyrė 26 % mažiau pacientų nei Oncotype Dx (atitinkamai 180 pacientų ir 243 pacientės). Be to, Prosigna priskyrė daugiau pacientų į aukštos rizikos grupę nei Oncotype Dx. Tačiau kiekvieno testo apibrėžtos žemos ir aukštos rizikos grupių baigtys, kurias iliustruoja persidengiančios Kaplan-Meier kreivės, yra panašios. Šis pastebėjimas paskatino nepriklausomus tyrėjus mūsų TransATAC tyrimo pagrindu padaryti išvadą, kad Prosigna vidutinės rizikos grupei priskyrė mažiau pacientų nei Oncotype DX RS, kai riba tarp žemos ir aukštos rizikos grupių yra lygiavertė arba aukštesnė.

31 paveikslas. Mazgeliams neigiamoms pacientėms Prosigna būklės pasikartojimo rizikos įvertis identifikavo kur kas daugiau aukštos rizikos pacientų ir mažiau vidutinės rizikos pacientų nei Oncotype DX RS įvertis.



Mazgeliui teigiamoms pacientėms su 1–3 teigiamais mazgeliais naudojant vien tik būklės pasikartojimo riziką, 6 pacientėms buvo prognozuojama < 10 % nutolusių būklės pasikartojimų rizika. Tyrimo metu nei viena iš šių pacientų neturėjo būklės pasikartojimo. Viena iš pacientų buvo stebėta 7,9 metus, o kitoms pacientėms būklės pasikartojimo nebuvo mažiausiai 9,9 stebėjimo metus. Tai rodo, kad mazgeliams teigiamoms pacientėms žemos rizikos prognozė pasitvirtina. Log-rank testas palyginimui nebuvo naudojamas, nes nebuvo RS žemos rizikos grupės.

32 paveikslas. Išgyvenamumo be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu rizikos grupių klasifikavimu nenaudojant klinikinio gydymo įvertio 10 palyginimas. Mazgeliams teigiamoms pacientėms (1–3 mazgeliai) (būklės pasikartojimo rizika ir RS)



1 klinikinio tyrimo išvados

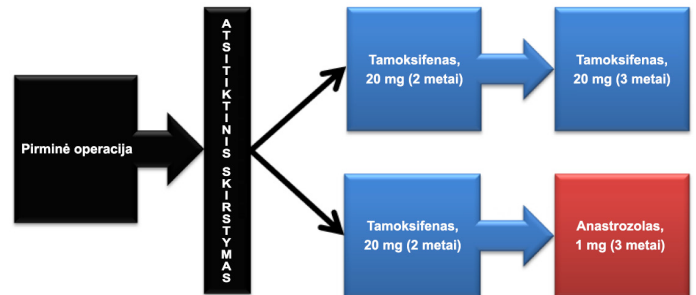
Pirminė analizė parodė, kad visoms pacientėms ir visiems iš anksto nustatytiems kliniškai reikšmingiems pogrupiams būklės pasikartojimo rizika pridėjo reikšmingos prognostinės informacijos standartinių klinikinių kintamųjų (klinikinio gydymo įvertio) atžvilgiu. Buvo parodyta, kad būklės pasikartojimo rizika suskirsto pacientes į 3 rizikos grupes, kurių baigtys yra statistiškai reikšmingai skirtingos mazgeliams neigiamoms pacientėms. Nepriklausomai nuo mazgelių būklės, luminalinis A ir luminalinis B vidiniai potipiai pasižymi reikšmingai skirtingu išgyvenamumu be nutolusių būklės pasikartojimų ir be būklės pasikartojimų. Palyginti su prognostiniu indikatoriumi RS (21 geno Oncotype Dx būklės pasikartojimo įvertis), visoms pacientėms ir kliniškai reikšmingiems pogrupiams būklės pasikartojimo rizika pridėjo prognostinės informacijos. Be to, mazgeliams neigiamoje grupėje būklės pasikartojimo rizika, palyginti su RS, priskyrė dvigubai daugiau pacientų aukštos rizikos grupei ir reikšmingai sumažino vidutinės rizikos grupei priskiriamų pacientų skaičių, nesumažindama baigčių skirtumo tarp žemos ir aukštos rizikos grupių.

2 tyrimas. Hormonų receptoriams teigiamų, krūties vėžio pacientų po menopauzės, kurioms taikoma vien tik sisteminė adjuvantų endokrininė terapija, prognozė, naudojant NanoString Prosigna testą: ABCSG-8 tyrimas

Tyrimo planas

Tyrimo kohortą sudaro nuo 1996 m. iki 2004 m. ABCSG-8 tyrime dalyvavusių pacientų FFPE krūties naviko audinio mėginiai, retrospektyviai surinkti ir archyvuoti ABCSG navikų banke¹⁵. Iš viso 3901 moteris po menopauzės su HR+ ankstyvos stadijos krūties vėžiu prieš gydymą buvo atsitiktinai suskirstytos į dvi grupes. Viena grupė dvejus metus buvo gydyta adjuvantu tamoksifenu, o po to trejus metus – Arimidex® (anastrozolu). Kita grupė penkerius metus buvo gydyta adjuvantu tamoksifenu. Tyrimo gydymo planas parodytas 33 paveiksle.

33 paveikslas. ABCSG-8 tyrimo plano schema.



Duomenų tikrinimo kohortą atitinka vertinama ABCSG-8 kohorta, kurios mėginius buvo galima gauti iš retrospektyviai archyvuoto ABCSG navikų banko buvo galima gauti mėginius ir kuriai buvo įmanoma gauti informuotų asmenų sutikimus arba pacientė buvo mirusi. Pacientės, kurios atitiko tinkamumo kriterijus pradiniam tyrimui, buvo atmetos tik tuo atveju, kai jų audinių nebuvo galima panaudoti NanoString tyrimui arba kai nebuvo gautas pakartotinis pacientės sutikimas. Kaip šio tyrimo dalis buvo tiriami visi mėginiai, turintys naviko bloką ir pacientų sutikimus.

Šiam tyrimui naudoti vidiniai potipiai, kurie gauti atlikus analizę ir kuriems vadovaujantis iš anksto numatyto analizės planu buvo apskaičiuotas būklės pasikartojimo rizikos įvertis, Būklės pasikartojimo rizikos įvertis, kurio intervalas yra nuo 0 iki 100, buvo apskaičiuotas naudojant 46 genų poaibį iš 50 tiriamųjų genų, kurie buvo anksčiau nurodyti publikacijose². Būklės pasikartojimo rizikos koeficientai buvo apskaičiuoti naudojant Cox modelį, kuris apima 46 genų, naudotų kiekvieno vidinio potipio apibrėžimui, Pearson koreliaciją, proliferacijos įvertį ir bendrą naviko dydį. Visi tyrimai buvo atlikti naudojant didžiausią stebėjimo duomenų imtį.

Pagrindinis rodiklis buvo išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų. Jis apibrėžiamas kaip intervalas nuo diagnozės iki nutolusio būklės pasikartojimo arba mirties nuo krūties vėžio. Antrinis rodiklis buvo išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo. Jis apibrėžiamas kaip intervalas nuo diagnozės iki pirmo būklės pasikartojimo (lokalus, regioninis arba nutolusio) arba mirties nuo krūties vėžio.

Norint įvertinti pagrindinį rodiklį atliekant būklės pasikartojimo rizikos testus, buvo pritaikyti daugiamačiai Cox proporcinės rizikos modeliai, kuriems buvo naudojami visi prieinami pacientų mėginiai. Modelis apėmė standartinius klinikinius kintamuosius (amžių, naviko laipsnį, bendrą naviko dydį, mazgelių būklę, adjuvantinį gydymą). Tada, pritaikius Cox modelį ir tikimybės santykio testą, buvo patikrinta, ar būklės pasikartojimo rizika statistiškai reikšmingai ($\alpha = 0,05$) papildė prognostinę informaciją, palyginus su klinikiniu gydymo įvertiu. Klinikinis gydymo įvertis yra kliniškai patologinių veiksnių optimizuotas derinys, sukurtas kaip standartinės patologijos matas¹². Pirminiai tyrimai buvo kartojami skirtingiems pacientų poaibiams (visų, mazgeliams neigiamų, mazgeliams teigiamų arba tik HER2 neigiamų) ir rodikliams (išgyvenamumui be lokalaus būklės pasikartojimo arba išgyvenamumui be būklės pasikartojimo).

Analizė

Buvo naudojamas nuoseklus metodas, kurio pagrindinis mokslinis tikslas buvo parodyti, kad būklės pasikartojimo rizika reikšmingai papildė prognostinę informaciją standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu. Pagrindinis tikslas lėmė papildomą reikalavimą parodyti, kad kategorinis klinikinės rizikos klasifikavimas į vieną iš trijų grupių (žemos / vidutinės / aukštos) reikšmingai papildė prognostinę informaciją standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu. Siekiant išpildyti šį reikalavimą, reikėjo įgyvendinti abu reikalavimus:

- Parodyti, kad tolydus būklės pasikartojimo rizikos įvertis reikšmingai papildė prognostinę informaciją standartinių klinikinių kintamųjų atžvilgiu.

- Jei atmetama nulinė hipotezė apie prognostinės informacijos nebuvimą, parodyti, kad būklės pasikartojimo rizika pagrįstos rizikos kategorijos papildo prognostinę informaciją standartinių klininių kintamųjų atžvilgiu.

Naudojant visus prieinamus pacienčių mėginius ir norint nustatyti pagrindinį nuoseklių būklės pasikartojimo rizikos tyrimų rodiklį, o tada iš anksto apibrėžtas būklės pasikartojimo rizika pagrįstas rizikos kategorijas, buvo pritaikyti daugiatis Cox proporcinės rizikos modeliai. Šie modeliai apėmė šiuos kategorinius standartinius klininius kintamuosius (su galimomis reikšmėmis):

- amžių (≥ 65 arba < 65);
- laipsnį (G1 arba G2/GX);
- bendrą naviko dydį (T1, T2/T3);
- mazgelių būklę (N0, N+(1-3), N+(≥ 4));
- Adjuvantų terapiją (vien tamoksifenas arba tamoksifenas → anastrozolas).

Čia N0 atitinka mazgeliams neigiamas pacientės, N+(1-3) – mazgeliams teigiamas pacientės su 1-3 teigiamais mazgeliais, o N+(≥ 4) atitinka mazgeliams teigiamas pacientės su 4 ar daugiau teigiamais mazgeliais. T1 žymj ≤ 2 cm skersmens naviką, T2 – didesnį nei 2 cm, bet mažesnę nei 5 cm skersmens naviką, o T3 – didesnį nei 5 cm skersmens naviką. Kadangi buvo tik 14 T3 mėginių, jie buvo sujungti su T2 mėginiais. Gerai diferencijuoti (G1) navikai buvo palyginti su vidutiniškai diferencijuotų (G2) ir GX lobulinių navikų deriniu. Analizės tikslais GX lobuliniai navikai buvo laikomi G2 navikais, nes pastarieji yra dažniausio laipsnio numatytos paskirties pacientų populiacijoje.

Šie kintamieji buvo įvesti į modelį skaičiuojant klinikinį gydymo įvertį. Klinikinį gydymo įvertį gautas pritaikius šį modelį:

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp\left(\sum_j z_j \gamma_j\right)$$

Čia z atitinka prieš tai pateiktus klininius ir gydymo kintamuosius, o klinikinį gydymo įvertį buvo apibrėžtas naudojant γ reikšmes, gautą iš pateikto modelio, t. y. klininis gydymo įvertis = $\sum_j z_j \gamma_j$.

Proporcinės rizikos prielaida buvo patikrinta naudojant Schoenfeld liekanas.

Pacientės, įtrauktos į duomenų patikros analizę, turėjo panašias charakteristikas kaip ir pacientės pradiniam ACBSG-8 tyrime.

30 lentelė. Klininių charakteristikų santrauka

Charakteristika	Vertė	Įtraukta (n = 1478)		Neįtraukta (n = 2236)		Iš viso (n = 3714)	
		Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%
Gydymas	Tik tamoksifenas	741	50,1 %	1108	49,3 %	1849	49,8 %
	Tamoksifenas → anastrozolas	737	49,9 %	1128	50,2 %	1865	50,2 %
ER būklė	Neigiama	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Teigiama	1464	99,1%	2199	98,3 %	3663	98,6 %
	Nežinoma	0	0 0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Laipsnis	G1	271	18,3 %	468	20,8 %	739	19,9 %
	G2	1152	77,9 %	1659	73,9 %	2811	75,7 %
	GX	55	3,7 %	109	4,9 %	164	4,4 %
Mazgelių būklė	N0	1047	70,8 %	1723	76,7 %	2770	74,6 %
	N+(1–3)	382	25,8 %	449	20,0 %	831	22,4 %
	N+(≥ 4)*	49	3,3 %	64	2,8 %	113	3,0 %
PgR būklė	Neigiama	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Teigiama	1218	82,4 %	1805	80,4 %	3023	81,4 %
	Nežinoma	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Naviko stadija	T1	1037	70,2 %	1745	77,7 %	2782	74,9 %
	T2	427	28,9 %	472	21,0 %	899	24,2 %
	T3	14	0,9 %	19	0,8 %	33	0,9 %
Amžius	Mediana	63		Nėra	64		
	Intervalas	41–79			41–80		

* įskaitant vieną pacientę su > 9 teigiamais mazgeliais

31 lentelė. Papildomos klininės charakteristikos

Charakteristika	Vertė	Pacienčių skaičius	Pacientės, %
NanoString vidiniai potipiai	Luminalinis A	1004	67,9 %
	Luminalinis B	418	28,3 %
	HER2 praturtintas	48	3,2 %
	Bazalinio tipo	8	0,5 %
Pasikartojimai	Atokūs	155	10,5 %
	Jokių	194	13,1 %
HER2 būklė	Neigiama	1397	94,5 %
	Teigiama	77	5,2 %
	Nežinoma	4	0,3 %

Rezultatai

Iš analizei turimų 1620 audinių 25 (1,5 %) neatitiko iš anksto apibrėžtų naviko tinkamumo patologinės apžiūros reikalavimų. Iš 1595 audinių mėginių 73 (4,6 %) su gyvybingu invaziniu audiniu neatitiko iš anksto apibrėžtų kokybės kontrolės reikalavimų išskirtai RNR. Iš 1522 RNR mėginių 44 (2, 9%) neatitiko Prosigna rezultatams taikomų kokybės kontrolės reikalavimų, todėl analizei tinkamų mėginių iš viso liko 1478 (91,2 %).

Iš analizei galimų 1478 pacienčių 155 buvo nutolęs būklės pasikartojimas, o 194 buvo lokalus arba nutolęs būklės pasikartojimas arba mirtis dėl krūties vėžio. Stebėjimo laiko mediana buvo 10 metų.

Pirminė analizė parodė, kad būklės pasikartojimo rizikos įvertis suteikė reikšmingos papildomos prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutolusių būklės pasikartojimų standartinių klininių kintamųjų (klinikinio gydymo įvertio) atžvilgiu.

32 lentelė. Pirminės analizės testavimo suvestinė

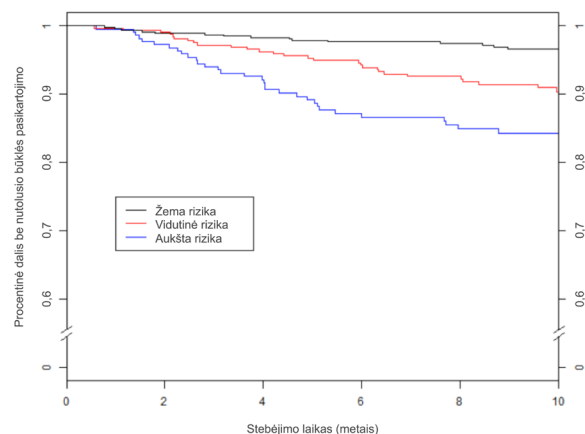
Nulinis modelis	Kintamas modelis	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 kritinė vertė (laisvės laipsnis)	$\chi^2 p$ reikšmė
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + rizikos grupė	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Antrinė analizė parodė, kad būklės pasikartojimo rizika yra reikšmingai susijusi su išgyvenamumu be nutolusių būklės pasikartojimų ir daugeliui kliniškai susijusių pogrų suteikia daugiau prognostinės informacijos ne klinikinio gydymo įvertis.

33 lentelė. Pirminės analizės testavimo kartojimas iš anksto nustatytiems pogrūpiams

Subjektų grupė	Pacienčių sk.	Atvejų sk.	CTS+ROR ir CTS	CTS+rizikos grupė ir CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (krit. vertė= 3,84)	$\Delta LR \chi^2$ (Krit. vertė = 5,99)
Visos	1478	155	53,49	34,12
HER2 neigiamos	1397	145	47,50	2994
N0	1047	86	2557	2336
N0, HER2 neigiamos	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2 neigiamos	367	56	22,75	18,75

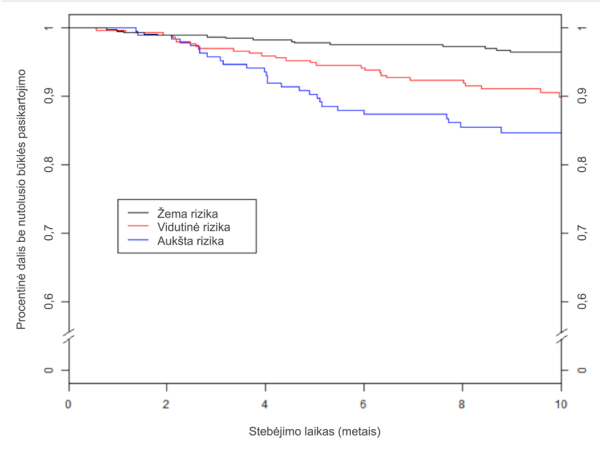
34 paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.



34 paveikslas. Duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusių būklės pasikartojimų pagal rizikos grupę mazgeliams neigiamoms pacientėms.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius 10 metų laikotarpiu	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusių būklės pasikartojimų 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4 % – 97,9 %]
Vidutinė	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3 % – 93,3 %]
Aukšta	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4 % – 88,6 %]
Iš viso	1047 (100 %)	75	

35 paveikslo duomenų suvestinė. HER2 neigiamų, mazgeliams teigiamų pacienčių išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal rizikos grupes.

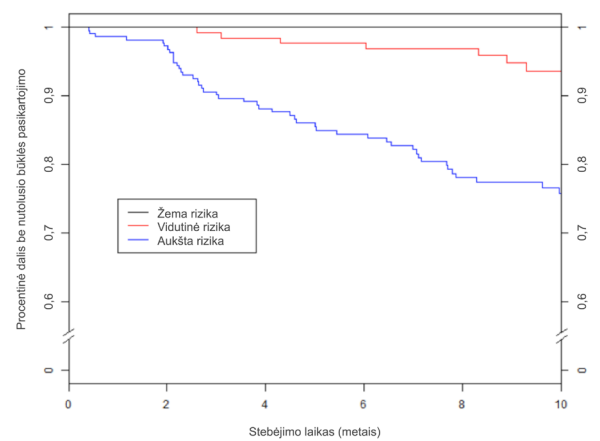


35 paveikslo duomenų suvestinė. HER2 neigiamų, mazgeliams teigiamų pacienčių išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal rizikos grupes.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusio būklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3 % - 97,9 %]
Vidutinė	311 (32 %)	27	90 % [85,6 % - 93,1 %]
Aukšta	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4 % - 89,3 %]
Iš viso	984 (100 %)	69	

36 paveiksle pavaizduotos Kaplan-Meier kreivės mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių rizikos grupės, o 37 paveiksle pavaizduotos tos pačios kreivės mazgeliams teigiamoms (1–3 mazgeliai), HER2 neigiamoms pacientėms. Rezultatai kartu su HER2 teigiamomis pacientėmis ir be jų yra panašūs.

36 paveikslas. Mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal rizikos grupę.

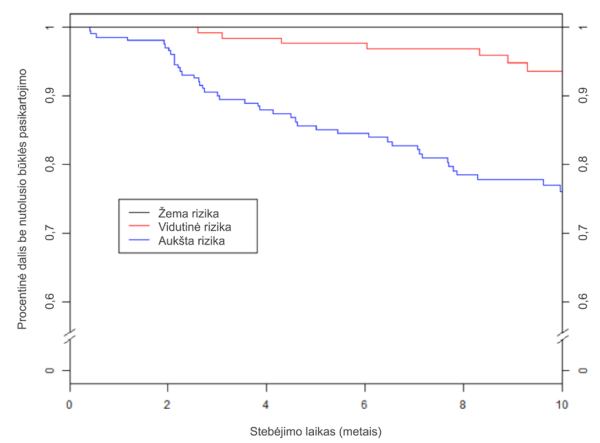


36 paveikslo duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių rizikos grupes.

Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius 10 metų laikotarpiu	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusio būklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Vidutinė	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9 % - 97 %]
Aukšta	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9 % - 81,4 %]
Iš viso	382 (100 %)	53	

* Pasikliautinis intervalas nustatytas Clopper-Pearson metodu.

37 paveikslas. Išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal HER2 neigiamų, mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių rizikos grupes.



37 paveikslo duomenų suvestinė. Išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo pagal HER2 neigiamų, mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių rizikos grupes.

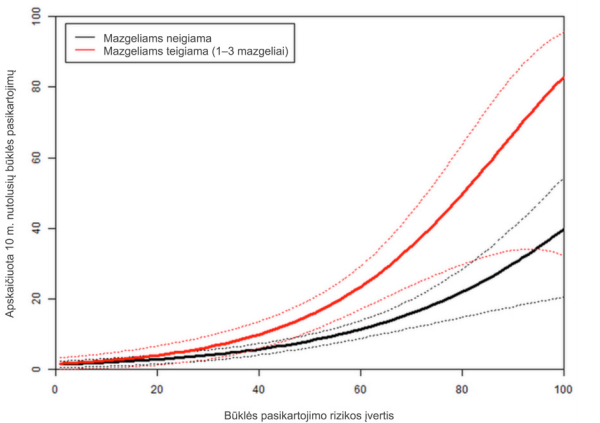
Rizikos grupė	Pacienčių skaičius (%)	Atvejų skaičius 10 metų laikotarpiu	Apskaičiuota procentinė dalis be nutolusio būklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Žema	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Vidutinė	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8 % - 96,9 %]
Aukšta	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0 % - 81,8 %]
Iš viso	367 (100 %)	50	

* Pasikliautinis intervalas nustatytas Clopper-Pearson metodu.

Būklės pasikartojimo rizikos ir prognozuojamos rizikos sąryšis

38 paveiksle parodyta 10 metų laikotarpio nutolusių būklės pasikartojimų rizika kaip būklės pasikartojimo rizikos funkcija su 95 % pasikliautiniais intervalais, kurie pagrįsti atskirais Cox proporcingos rizikos modeliais kiekvienai mazgeliams neigiamų ir mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių grupei. Mazgeliams teigiamoms (1–3 mazgeliai) pacientėms proporcingos rizikos prielaida buvo pažeista taikant visam intervalui. Čia pateikta mazgeliams teigiamų (1–3 mazgeliai) pacienčių kreivė paremta mazgeliams teigiamomis (1–3 mazgeliai) pacientėmis, kurių būklės pasikartojimo rizikos įvertis yra 0–80 intervale, kuriame taikoma proporcingos rizikos prielaida.

38 paveikslas. Apskaičiuota nutolusių būklės pasikartojimų rizika dešimties metų laikotarpiu pagal mazgelių kategorijas su 95 % pasikliautiniais intervalais.



Kiekviename pogrupyje žemos rizikos kategorijos pacienčių absoliuti klinikinė rizika žymiai skyrėsi nuo aukštos rizikos kategorijos pacienčių absoliučios klinikinės rizikos.

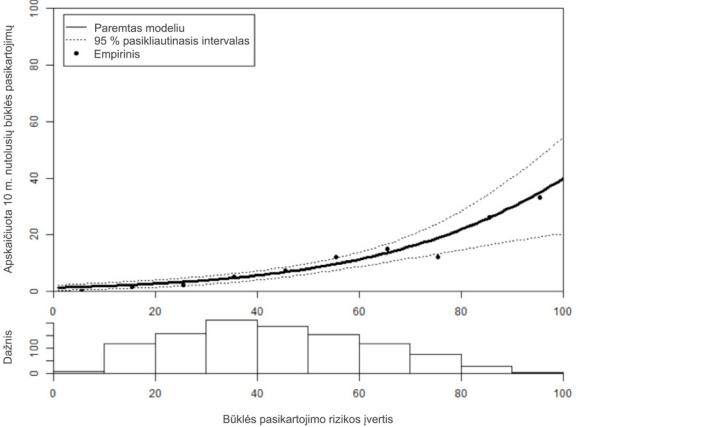
34 lentelėje pateikti mazgeliams neigiamų pacienčių būklės pasikartojimo rizikos pasiskirstymo 10 vienetų intervaluose duomenys. Be to, pateikta ir 10 metų nutolusio būklės pasikartojimo rizika.

34 lentelė. Mazgeliams neigiamų pacienčių nutolusių būklės pasikartojimų rizikos pasiskirstymas 10 vienėtų intervaluose

Būklės pasikartojimo rizikos intervalas	Pacienčių skaičius	Pacienčių proc.	10 metų nutolusio būklės pasikartojimo rizika (empirinė)
1-10	7	0,7 %	0,0 %
11-20	116	11,1 %	1,8 %
21-30	155	14,8 %	2,5 %
31-40	209	20,0 %	5,1 %
41-50	183	17,5 %	7,5 %
51-60	152	14,5 %	12,1 %
61-70	116	11,1 %	15,0 %
71-80	77	7,4 %	12,3 %
81-90	28	2,7 %	26,1 %
91-100	4	0,4 %	33,3 %
Iš viso	1047	100 %	

39 paveiksle pavaizduota modelių pagrįsta mazgeliams neigiamų pacienčių kreivė kartu su 10 empiriškai apskaičiuotų 10 metų išgyvenamumo intervalų, kur intervalas atitinka 10 vienėtų būklės pasikartojimo rizikos intervalą (1-10, 11-20 ir t. t.). Po kreivės pavaizduota histograma, rodanti dažnių pasiskirstymą intervaluose.

39 paveikslas. Modelių pagrįstos ir empiriškai apskaičiuotos dešimties metų nutolusių būklės pasikartojimų rizikos palyginimas mazgeliams neigiamoms pacientėms ir toliau pateiktas būklės pasikartojimo rizikos įverčių pasiskirstymas.



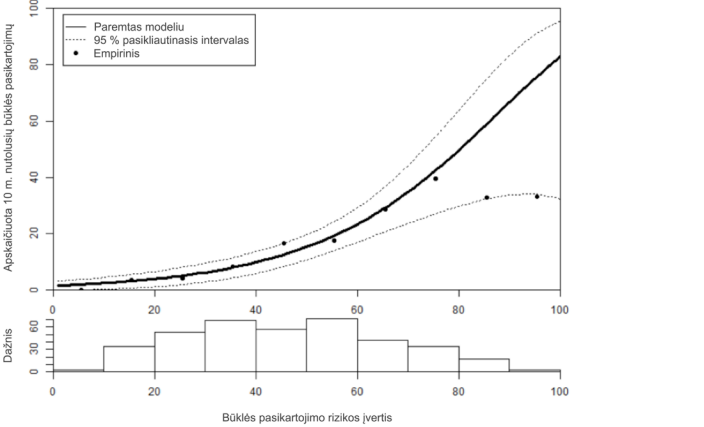
Mazgeliams neigiamoms pacientėms proporcingos rizikos modelių pagrįsti įverčiai buvo panašūs į empirinius įverčius visame intervale. 35 lentelėje parodytas mazgeliams teigiamų (1-3 mazgeliai) pacienčių būklės pasikartojimo rizikos pasiskirstymas 10 vienėtų intervaluose. Be to, pateikta ir 10 metų nutolusio būklės pasikartojimo rizika.

35 lentelė. Mazgeliams teigiamų (1-3 mazgeliai) pacienčių būklės pasikartojimo rizikos pasiskirstymas 10 vienėtų intervaluose.

Būklės pasikartojimo rizikos intervalas	Pacienčių skaičius	Pacienčių proc.	10 metų nutolusio būklės pasikartojimo rizika (empirinė)
1-10	3	0,8 %	0,0 %
11-20	34	8,9 %	3,6 %
21-30	53	13,9 %	4,1 %
31-40	68	17,8 %	8,5 %
41-50	57	14,9 %	16,7 %
51-60	71	18,6 %	17,8 %
61-70	42	11,0 %	28,9 %
71-80	34	8,9 %	39,5 %
81-90	17	4,5 %	33,0 %
91-100	3	0,8 %	33,3 %
Iš viso	382	100 %	

40 paveiksle pavaizduota modelių pagrįsta mazgeliams teigiamų (1-3 mazgeliai) pacienčių kreivė (naudojant mazgeliams teigiamas (1-3 mazgeliai) pacientės su būklės pasikartojimo rizikos įverčiais ≤ 80) kartu su 10 empiriškai apskaičiuotų 10 metų išgyvenamumo intervalų, kur intervalas atitinka 10 vienėtų nutolusių būklės pasikartojimų rizikos intervalą (1-10, 11-20 ir t. t.). Po kreivės pavaizduota histograma, rodanti dažnių pasiskirstymą intervaluose.

40 paveikslas. Modelių pagrįstos ir empiriškai apskaičiuotos 10 metų nutolusių būklės pasikartojimų rizikos palyginimas mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) pacientėms ir toliau pateiktas būklės pasikartojimo rizikos įverčių pasiskirstymas.



35 lentelėje ir 40 paveiksle matomas stebimos 10 metų rizikos suploktėjimas būklės pasikartojimo rizikos intervalo viršuje, todėl proporcingos rizikos prielaida nepasitvirtino. Tačiau reikia pabrėžti, kad mėginių imtis abiejuose intervaluose virš 80 mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) pacientėms buvo maža (17 pacienčių 81-90 intervale ir tik 3 pacientės 91-100 intervale).

Luminalinio A ir luminalinio B vidinio potipio palyginimas

Dauguma tyrime dalyvavusių (96 %) tiriamųjų priklausė arba luminaliniam A, arba luminaliniam B potipiui, o to ir buvo tikėtasi, nes šie vidiniai potipiai vyrauja tarp hormonų receptorių teigiamų pacienčių¹².

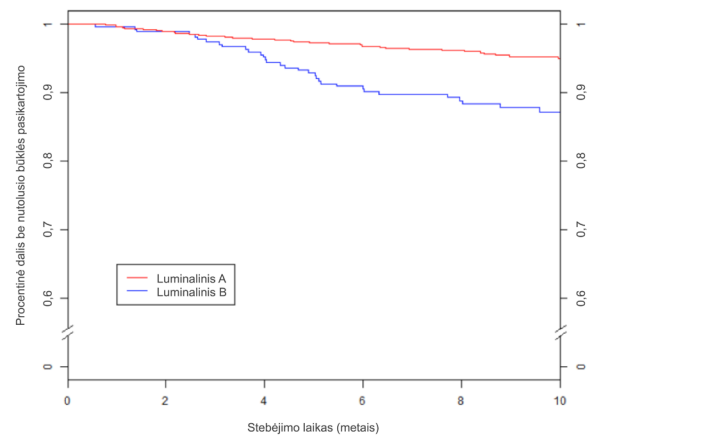
36 lentelėje pateikti tikimybių santykio testo rezultatai, rodantys papildomą luminalinio A / luminalinio B potipių išgyvenamumo be nutolusio būklės pasikartojimo prognostinę vertę klinikinio gydymo įverčio atžvilgiu. Lentelėje taip pat pateikti luminalinių A ir luminalinių B pacienčių rizikų santykiai. Luminalinių A pacienčių nutolusio būklės pasikartojimo rizika buvo reikšmingai mažesnė visose trijose grupėse.

36 lentelė. Tikimybių santykių testas luminalinių potipių išgyvenamumo be nutolusio būklės pasikartojimo prognostinei vertei nustatyti.

Pogrupis	Pacienčių sk.	Atvejų sk.	$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2 p$ reikšmė	LumA : LumB pavojaus santykis (95 % PI)
Visos	1422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30-0,59]
NO	1009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30-0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19-0,58]

41 paveiksle palygintas mazgeliams neigiamų pacienčių luminalinių potipių išgyvenamumas be nutolusio būklės pasikartojimo, o 42 paveiksle pateiktas toks pats palyginimas mazgeliams teigiamoms (1-3 mazgeliai) pacientėms. Abiejose grupėse buvo reikšmingų išgyvenamumo be nutolusio būklės pasikartojimo skirtumų tarp luminalinio A ir luminalinio B potipio pacienčių.

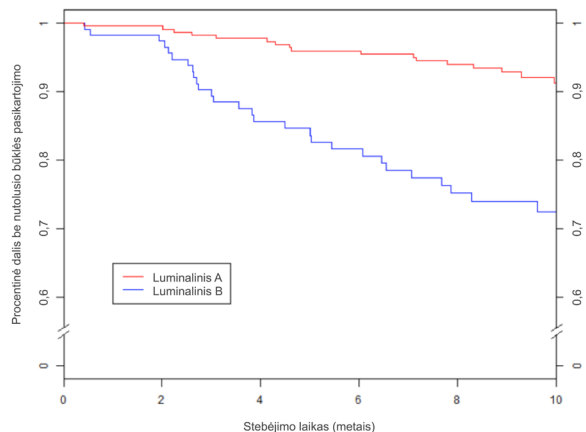
41 paveikslas. Mazgeliams neigiamų pacienčių išgyvenamumo be nutolusio būklės pasikartojimo pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.



41 paveikslo duomenų suvestinė. Mazgeliams neigiamų pacientų išgyvenamumo be nutulio bûklės pasikartojimo pagal vidinį potipį Kaplan-Meier kreivės.

Rizikos grupė	Pacientų skaičius	Atvejų skaičius 10 metų laikotarpiu	Apskaičiuota procentinė dalis be nutulio bûklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Luminalinis A	725	32	95,1 % [93,4 % – 96,3 %]
Luminalinis B	284	32	87,2 % [83,2 % – 90,3 %]
Iš viso	1009	64	

42 paveikslas. Išgyvenamumo be nutulio bûklės pasikartojimo Kaplan-Meier kreivės mazgeliams teigiamoms (1–3 mazgeliai) pacientėms pagal vidinius potipius.



42 paveikslo duomenų suvestinė. Išgyvenamumo be nutulio bûklės pasikartojimo Kaplan-Meier kreivės mazgeliams teigiamoms (1–3 mazgeliai) pacientėms pagal vidinius potipius.

Rizikos grupė	Pacientų skaičius	Atvejų skaičius 10 metų laikotarpiu	Apskaičiuota procentinė dalis 10 metų be nutulio bûklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
Luminalinis A	248	17	91,3 % [87,2 % – 94,2 %]
Luminalinis B	118	28	72,5 % [64,2 % – 79,1 %]
Iš viso	366	45	

37 lentelėje pateiktos 10 metų išgyvenamumo be bûklės pasikartojimo reikšmės pagal luminalinį potipį mazgeliams neigiamose ir mazgeliams teigiamose (1–3 mazgeliai) grupėse.

37 lentelė. Dešimties metų išgyvenamumo be bûklės pasikartojimo reikšmės pagal mazgelių grupę ir luminalinį potipį.

Mazgelių bûklė	Luminalinis potipis	Pacientų skaičius (%)	Atvejų skaičius per 10 metų	Apskaičiuota procentinė dalis be nutulio bûklės pasikartojimo 10 metų laikotarpiu [95 % PI]
N0	Luminalinis A	725 (72)	44	93,0 % [91,1 % – 94,5 %]
	Luminalinis B	284 (28)	44	82,2 % [77,6 % – 85,9 %]
N+(1–3)	Luminalinis A	248 (68)	21	89,1 % [84,7 % – 92,4 %]
	Luminalinis B	118 (32)	30	71,6 % [62,2 % – 77,4 %]

Kiekvienoje mazgeliams neigiamoje ir mazgeliams teigiamoje (1–3 mazgeliai) pacientų populiacijoje buvo reikšmingas skirtumas tarp luminalinio A ir luminalinio B potipio pacientų.

2 klinikinio tyrimo išvados

Buvo parodyta, kad bûklės pasikartojimo rizika reikšmingai papildo prognostinę informaciją standartinių klinikinių ir gydymo kintamųjų atžvilgiu, kai yra įtraukiama kaip tolydus matas arba naudojant iš anksto apibrėžtas rizikos grupes. Kaip tikėtasi, 10 metų išgyvenamumas be nutulio bûklės pasikartojimo žemos rizikos grupėje buvo 90 %. Aukštos rizikos grupėje 10 metų išgyvenamumas be nutulio bûklės pasikartojimo buvo 80 %, o tai yra didesnis išgyvenamumas, nei tikėtasi – buvo tikėtasi gerokai mažesnio nei 80 % išgyvenamumo. Rizikos grupės apibrėžiančios ribos buvo pagrįstos TransATAC kohorta, kuri yra didesnės rizikos nei ši kohorta, todėl aukštos rizikos grupės bendra rizika buvo mažesnė nei tikėtasi. Bûklės pasikartojimo rizikos (tolydi ir pagrįsta rizikos grupėmis) prognostinė informacija buvo panaši visuose pogrupiuose. Tolydus rizikos modelis gerai atitiko empirinius bûklės pasikartojimo dydžius tiek mazgeliams neigiamoje, tiek mazgeliams teigiamoje (1–3 mazgeliai) pacientų populiacijose. Didžioji dalis šio tyrimo pacientų (96 %) turėjo vieno iš dviejų luminalinių potipių (luminalinio A arba luminalinio B)

navikus. Visose mazgelių bûklės grupėse luminalinio A / luminalinio B potipių skirtumas pridėjo prognostinės informacijos apie išgyvenamumą be nutulio bûklės pasikartojimo.

Jungtinio klinikinio tyrimo suvestinė

Rezultatai yra bendro pobūdžio ir gali būti naudojami, nes mėginiai dviejų klinikinio patikrinimo tyrimų metu buvo nusiųsti ir ištirti skirtingose laboratorijose. Buvo parodyta, kad bûklės pasikartojimo rizika reikšmingai papildo standartinių klinikinių ir gydymo kintamųjų prognostinę informaciją, kai ji naudojama kaip tolydus matas arba kaip trys iš anksto apibrėžtos rizikos grupės. Be to, aposteriorinėje analizėje visoms pacientėms bûklės pasikartojimo rizika reikšmingai papildo standartinių klinikinių kintamųjų informaciją 5 metų išgyvenamumui be lokalaus bûklės pasikartojimo. Bûklės pasikartojimo rizikos (tolydi ir pagrįsta rizikos grupėmis) prognostinė informacija buvo panaši visuose pogrupiuose. Taip pat buvo atlikta riboto išgyvenamumo be bûklės pasikartojimo analizė. Bûklės pasikartojimo rizikos klasės taip pat sėkmingai apibrėžė tris rizikos grupes su skirtingu išgyvenamumu be bûklės pasikartojimo. Abiejų tyrimų metu nustatytas reikšmingas skirtumas tarp išgyvenamumo be nutulio bûklės pasikartojimo luminaliniame A ir luminaliniame B pogrupyje, kuris nepriklausė nuo mazgelių bûklės.

17 LITERATŪRA

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317–25.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160–1167.
- Dowsett M. et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783–90.
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222–5232.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458–471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731–734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Volume 24.
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. Journal of Clinical Oncology 2014; Oct 20 ePub ahead of print JCO.2014.55.6894.
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12):1135–41.
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012;30(7): 722–728.
- Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829–1834.

12. Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 4273–4278.
13. (a) Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: Combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005; 366(9484): 455–462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncology* 2006; 7(12): 991–996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of Oncology* 2014; 25(2):339–45.

19 KONTAKTINĖ INFORMACIJA

NanoString Technologies®, Inc.



JAV kontaktinė informacija:
NanoString Technologies, Inc.
530 Fairview Ave N
Seattle, WA, 98109 USA
Telefonas 888-358-NANO (888-358-6266) Faksas 206-378-6288



Ilgaliotasis atstovas Europos Sąjungoje:
Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP Hague
Nyderlandai

Bendroji kontaktinė informacija
Techninės pagalbos el. paštas: dxsupport@nanosttring.com
Produkto informacijos el. paštas: info@prosigna.com
Svetainė: www.prosigna.com

18 SIMBOLIAI IR APIBRĖŽIMAI



– gamintojas



– ilgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje



– *in vitro* diagnostinė medicininė priemonė



– žr. naudojimo instrukcijas



– CE ženklas



– serijos kodas / partijos numeris



– serijos numeris



– turinio pakanka <n> testų



– laikymo sąlygų temperatūrų intervalas



– laikymo sąlygų temperatūros apatinė riba



– laikymo sąlygų temperatūros viršutinė riba



– skirta naudoti iki / galiojimo data



– pagaminimo data

Kambario temp. = Kambario temperatūra

HYB = Hibridizacija

Teisinis atsakomybės apribojimas

Skirta *in vitro* diagnostikai.

© 2012–2020 NanoString Technologies. Visos teisės saugomos. NanoString, NanoString Technologies, NanoString logotipas, nCounter, Prosigna ir Prosigna logotipas yra registruotieji NanoString Technologies, Inc. prekių ženklai JAV ir (arba) kitose šalyse.