

Uputa o proizvodu
**Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
 (Prognostički genski test za rak dojke Prosigna®)**


Verzija 04, stvorena 2025-06



2 – 10 testova

Uvjeti pohrane

	-20 °C Pohranite na -20 °C ili nižoj temperaturi	Kasete za prognostički genski test za rak dojke Prosigna
	-80 °C Pohranite na -80 °C ili nižoj temperaturi	CodeSet za prognostički genski test za rak dojke Prosigna
	+25 °C Pohranite na sobnoj temperaturi	Paket za pripremu za prognostički genski test za rak dojke Prosigna
	+8 °C Pohranite na +4 °C	Ploče za pripremu za prognostički genski test za rak dojke Prosigna

SADRŽAJ

1	NAMJENA/SVRHA	1
2	SAŽETAK SUSTAVA ISPITIVANJA	1
2.1	Principi sustava za analizu nCounter	2
2.2	Principi algoritma Prosigna za izračunavanje rezultata	2
3	DOSTAVLJENI REAGENSI I OPREMA	2
3.1	Pregled kompleta Prosigna	2
3.2	Sadržaj kompleta Prosigna za komplet Prosigna za 2, 3, 4, ili 10 testova	3
4	UPOZORENJA I MJERE OPREZA	3
5	OPĆENITA RAZMATRANJA O TESTU	3
5.1	Obrada tkiva	3
5.2	Izvođenje testa Prosigna	4
6	INFORMACIJE O OBUCI	4
7	ODLAGANJE OTPADA	4
8	SKLADIŠTENJE I RUKOVANJE (REAGENSI)	4
9	UREĐAJI POTREBNI ZA TEST PROSIGNA	4
10	REAGENSI I OPREMA KOJI SU POTREBNI, ALI NISU ISPORUČENI	4
10.1	Materijali	4
10.2	Oprema	4
10.3	Specifikacije opreme	5
11	PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORKA	5
11.1	Zahtjevi za uzorke tkiva i patološki pregled	5
11.2	Prikupljanje i pohrana uzoraka	5
11.3	Priprema stakalca	5
11.4	Obrada stakalca	5
11.5	Izoliranje RNA	6
11.6	Mjerenje koncentracije i kvalitete RNA	6
11.7	Postupak testa	6
12	RJEŠAVANJE PROBLEMA I POGREŠKE TESTA	9
13	REZULTATI TESTA	9
13.1	Intrinzični podtipovi	9
13.2	ROR ocjena	10
13.3	Vjerojatnost 10-godišnjeg udaljenog recidiva	10
13.4	Klasifikacija rizika	10
13.5	Kontrola kvalitete	10
14	OGRAĐENJA POSTUPAKA	10
15	OČEKIVANE VRIJEDNOSTI	11
15.1	ROR raspon prema podtipu	11
15.2	Učestalost ROR ocjene prema statusu čvora	11
15.3	Preživljenje bez udaljenog recidiva prema kategorizaciji rizika	11

16.1	Analička preciznost i reproducibilnost	12
16.2	Osjetljivost/RNA unos	13
16.3	Testiranje interferencija	13
16.4	Klinička izvedba	14
17	LITERATURA	25
18	SIMBOLI I DEFINICIJE	26
19	INFORMACIJE O KONTAKTU	26

1 NAMJENA/SVRHA

Prognostički genski test za rak dojke Prosigna® je *in vitro* dijagnostički test koji upotrebljava profil ekspresije gena stanica koje se nalaze u tkivu raka dojke radi procjene rizika bolesnika za udaljeni recidiv. Test mjeri profil ekspresije gena pomoću RNA ekstrahirane iz tkiva tumora dojke fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin (FFPE). Podaci o ekspresiji gena ponderirani su zajedno s kliničkim varijablama kako bi se generirali podtip (luminalni A, luminalni B, HER2-enriched ili nalik bazalnom) i ocjena koja upućuje na vjerojatnost udaljenog recidiva. Test se provodi na sustavu za analizu nCounter® pomoću tkiva tumora dojke fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin, a koje je prethodno dijagnosticirano kao invazivni karcinom dojke.

Prognostički genski test za rak dojke Prosigna indiciran je za upotrebu kod bolesnica s rakom dojke kojima je obavljena mastektomija ili konzervativna terapija dojke zajedno s lokoregionalnim liječenjem u skladu sa standardima njege, ili kao:

- Prognostički indikator za preživljenje bez udaljenog recidiva nakon 10 godina u žena u postmenopauzi s rakom dojke I. ili II. stadija pozitivnim na hormonski receptor (HR+), s negativnim limfnim čvorovima, koji treba liječiti samo adjuvantnom hormonskom terapijom kada se upotrebljava zajedno s ostalim kliničkopatološkim faktorima.
- Prognostički indikator za preživljenje bez udaljenog recidiva nakon 10 godina u žena u postmenopauzi s rakom dojke II. ili IIIA. stadija pozitivnim na hormonski receptor (HR+), s pozitivnim limfnim čvorovima (1 do 3 pozitivna čvora ili 4 ili više pozitivnih čvorova), koji treba liječiti samo adjuvantnom hormonskom terapijom kada se upotrebljava zajedno s ostalim kliničkopatološkim faktorima.

2 SAŽETAK SUSTAVA ISPITIVANJA

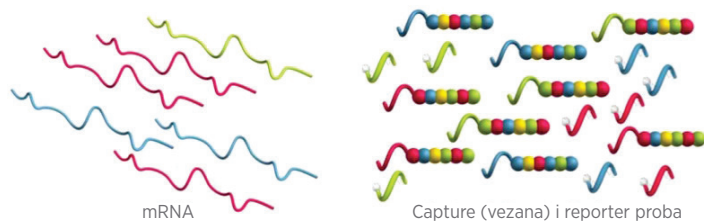
Sustav za analizu nCounter daje izravna, složena mjerenja ekspresije gena putem digitalnih očitavanja relativnog mnoštva transkripata mRNA pomoću sljedećih koraka: 1) hibridizacija RNA na fluorescentne reporter probe i vezane probe, 2) pročišćavanje kompleksa mete/probe pomoću ploča za pripremu nCounter koje sadrže reagentne potrebne za obradu nakon hibridizacije i imobilizaciju na kaseti nCounter na stanici za pripremu nCounter i 3) analiza kasete nCounter na digitalnom analizatoru nCounter kako bi se dobili rezultati ispitivanja¹. I vezana i reporter proba sadrže jedinstveni slijed DNA probe za ciljnu hibridizaciju i pročišćavanje. Vezana i reporter proba kombinirane su s pozitivnim i negativnim kontrolama radi stvaranja skupa CodeSet. Prosigna istovremeno mjeri razine ekspresije 50 gena koji se upotrebljavaju za algoritam klasifikacije intrinzičnog podtipa², 8 osnovnih gena koji se upotrebljavaju za normalizaciju signala, 6 pozitivnih kontrola i 8 negativnih kontrola u jednoj reakciji hibridizacije uz upotrebu proba za nukleinske kiseline dizajniranih posebno za te gene. U komplet Prosigna uključen je i referentni uzorak koji se sastoji od *in vitro* transkribiranih RNA meta za svaki od 58 gena. Referentni se uzorak ispituje sa svakom serijom prisutnosti uzoraka RNA bolesnika radi kvalificiranja ciklusa i normalizacije signala iz svakog gena.

Test Prosigna izvodi se na RNA izoliranom iz tkiva tumora dojke fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin. Patolog pregledava stakalca obojena hematoksilinom i eozinom (H&E) te utvrđuje (i označava) područje invazivnog karcinoma dojke koje je podobno za ispitivanje. Patolog također mjeri površinu tumora, što određuje broj neobojenih stakalaca koja su potrebna za ispitivanje, te staničnost tumora kako bi se osigurala prisutnost dovoljno tumorskog tkiva za ispitivanje. Kvalificirani tehnolog izvodi na neobojenim stakalcima makrodisekciju područja koje odgovara označenom području tumora na stakalcima obojenima hematoksilinom i eozinom te izolira RNA iz tkiva. Takva se izolirana RNA potom ispituje na sustavu za analizu nCounter kako bi se dobili rezultati ispitivanja, uključujući intrinzični podtip, ocjenu rizika od recidiva (ROR) te kategorija rizika.

2.1 Principi sustava za analizu nCounter

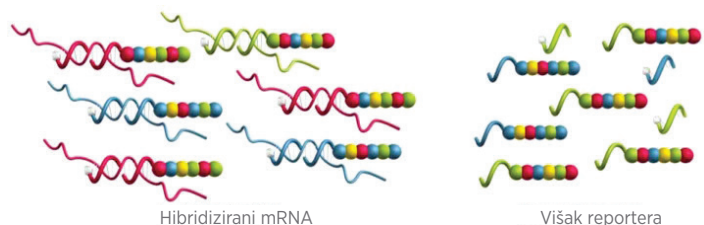
Sustav za analizu nCounter upotrebljava parove proba specifične za gen (Slika 1) koji se hibridiziraju izravno na uzorak mRNA u otopini, uklanjajući enzimsku reakciju koje bi mogle uvesti odstupanja u rezultate. U prvom koraku testa, DNA probe se hibridiziraju izravno na područje od 70 do 100 parova baza uzorka RNA u otopini. Fluorescentna reporter proba sastoji se od slijeda 35 do 50 baznih parova probe koja je komplementarna s mRNA metom i jedinstvenog osnovnog DNA slijeda koji se hibridizira na šest RNA segmenata označenih jednom od četiriju boja: crvena (R), žuta (Y), plava (B) ili zelena (G). Fluorescentni segmenti stvaraju fluorescentni „kod u boji“ od šest položaja/četiri boje koji je jedinstven za svaku metu. Zasebna vezana proba sastoji se od slijeda 35 do 50 baznih parova probe, koja je komplementarna s mRNA metom, i biotinom koji se upotrebljava za imobilizaciju na stakalce obloženo streptavidinom.

Slika 1: Hibridizacija skupa CodeSet na mRNA



Nakon hibridizacije, svi koraci pročišćavanja uzorka automatski se izvode na nCounter stanici za pripremu. Najprije se uklanja višak vezane i reporter probe (Slika 2) pomoću uzastopnih koraka hvatanja magnetskim kuglicama, nakon čega slijedi vezanje kompleksa probe-mete na nasumične lokacije na površini nCounter kasete putem povezanosti streptavidina i biotina (Slika 3). Na kraju, kompleksi probe/mete poravnati su i imobilizirani (Slika 4) u nCounter kaseti.

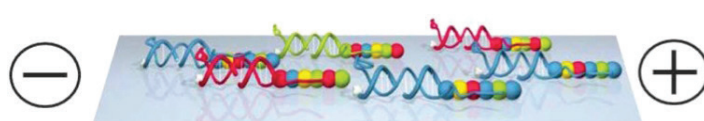
Slika 2: Uklanjanje viška reportera



Slika 3: Vezanje hibridiziranih reportera na površinu kasete



Slika 4: Poravnanje i imobilizacija hibridiziranih reportera



Nakon što završi obrada uzorka, kasete se postavljaju u nCounter digitalni analizator radi prikupljanja podataka. Svaka ciljna molekula interesa identificira se bojom koju generira šest poredanih fluorescentnih točaka prisutnih na pridruženoj reporter probi. Reporter probe na površini kasete zatim se broje i tabuliraju za svaku ciljnu molekulu i obrađuju pomoću algoritma (Slika 5).

Slika 5: Prikupljanje podataka

Šifra	Gen	Zbroj
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Principi algoritma Prosigna za izračunavanje rezultata

Test se temelji na prijavljenom 50-genskom algoritmu za klasifikaciju izvornog imena PAM502 i izvodi se na sustavu za analizu nCounter pomoću RNA ekstrahirane iz uzoraka tkiva tumora dojke fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin (FFPE). Algoritam upotrebljava profil ekspresije 50 gena za dodjeljivanje raka dojke jednom od četiri molekularna razreda ili intrinzičnih podtipova: luminalni A, luminalni B, HER2-enriched ili nalik bazalnom². Prototipični profili ekspresije gena (npr. centroid) četiri intrinzična podtipa retrainirani su na sustavu za analizu nCounter pomoću uzoraka tkiva dojke fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin prikupljenih na više kliničkih lokacija u Sjevernoj Americi. Nakon izvođenja testa na uzorku bolesnika za ispitivanje, računalni algoritam koji se temelji na Pearsonovoj korelaciji uspoređuje normalizirani profil ekspresije 50 gena uzorka bolesnika za ispitivanje s prototipičnim profilima ekspresije četiriju intrinzičnih podtipova raka dojke. Uzorku bolesnika za ispitivanje dodijeljen je podtip s najvišom Pearsonovom korelacijom.

Algoritam dalje prijavljuje ocjenu rizika od ponavljanja bolesti (ROR) na skali od 0 do 100³, što je korelirano s vjerojatnošću udaljenog recidiva nakon deset godina za žene u postmenopauzi s rakom dojke u ranom stadiju pozitivnim na hormonski receptor⁴. Izvješće također daje kategoriju rizika (nizak, srednji ili visok). Ocjena rizika ponavljanja bolesti izračunava se koeficijentima iz modela Cox koji uključuje Pearsonovu korelaciju podskupa 46 gena od 50 gena prema centroidu svakog intrinzičnog podtipa, ocjeni proliferacije i veličini vidljivog tumora. Varijable ispitivanja množe se odgovarajućim koeficijentima iz modela Cox radi generiranja ocjene, koja se zatim prilagođava na ljestvici od 0 do 100 na temelju koeficijenata generiranih iz trening skupa uzoraka tumora dojke fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin. Kategorije rizika također se prijavljuju na temelju graničnih vrijednosti za ROR određenih kliničkim validacijskim ispitivanjem.

3 DOSTAVLJENI REAGENSI I OPREMA

3.1 Pregled kompleta Prosigna

Komplet Prosigna sadrži dovoljno reagensa za obradu 2, 3, 4 ili 10 uzoraka bolesnika ovisno o naručenom proizvodu. Informacije o naručivanju potražite u nastavku. Komplet Prosigna sadrži skup CodeSet, jednu tubu referentnog uzorka za svaki komplet 2-10 testova i potrošan materijal koji su testirani zajedno za određivanje radnog učinka prije puštanja u prodaju.

Kataloški broj	Broj testova u kompletu	Uključene tube referentnog uzorka
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Preporučeno za upotrebu zajedno s kompletom za ekstrakciju RNA Veracyte FFPE extraction kit (550100). Ovaj komplet za ekstrakciju RNA dostupan je samo putem tvrtke Veracyte.

3.2 Sadržaj kompleta Prosigna za komplet Prosigna za 2, 3, 4, ili 10 testova

Broj testova	2	3	4	10
Kutija Prosigna CodeSet				
Skup Prosigna Reporter CodeSet	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL
Skup Prosigna Capture ProbeSet	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL
Referentni RNA uzorak Prosigna	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL
Naljepnica s crtičnim kodom skupa CodeSet	1	1	1	1
Šifra konfiguracije testa	1	1	1	1
Kutija s pločicama za pripremu Prosigna				
Pločice za pripremu	1	1	1	2
Kutija s kasetama Prosigna				
Kasete nCounter	1	1	1	1
Kutija s paketom za pripremu Prosigna				
Nastavci za stanicu za pripremu nCounter	1	1	1	1
Ljepljivi poklopac za kasetu nCounter	2	2	2	2
Ovojnice za nastavke nCounter	2	2	2	2
Pufer za hibridizaciju nCounter	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
Epruvete u nizu s 12 jažica i urezima	4	4	4	4
Čepovi za epruvete u nizu s 12 jažica i urezima	4	4	4	4

Opis sadržaja

Skup Prosigna CodeSet

Skup Prosigna Reporter CodeSet

pufer, nukleinske kiseline s fluorescentnim bojama
pufer, nukleinske kiseline
pufer, nukleinske kiseline
list s naljepnicom
kartica s naljepnicom

Skup Prosigna Capture ProbeSet

Referentni RNA uzorak Prosigna

Naljepnica s crtičnim kodom skupa CodeSet

Šifra konfiguracije testa

Pločice za pripremu Prosigna

Pločice za pripremu

superparamagnetske čestice, pufer, soli, oligonukleotidi, čestice polistirena koje sadržavaju fluorescentne boje

Kasete Prosigna

Kasete nCounter

kasete za uzorke

Paket za pripremu Prosigna

Pufer za hibridizaciju nCounter

Epruvete u nizu s 12 jažica i urezima

Čepovi za epruvete u nizu s 12 jažica i urezima

Nastavci za stanicu za pripremu nCounter

pufer, soli
plastični nizovi
plastični poklopci
2 nosača s 90 nastavaka + 6 bušača
nCounter
ljepljivi filmovi
držači nastavaka sa 6 jažica

Ljepljivi poklopac za kasetu nCounter

Ovojnice za nastavke nCounter

4 UPOZORENJA I MJERE OPREZA

1. Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
2. Ovaj je test namijenjen uporabi rukovatelja kvalificiranih za vrlo složene tehnike molekularne biologije na temelju lokalnih propisa.
3. Nemojte miješati sastavne dijelove kompleta iz različitih partija proizvoda Prosigna. Funkcionalnost se može jamčiti samo za dostavljene partije kompleta Prosigna jer su na taj način kvalificirani tijekom proizvodnje.
4. Preostali reagens ne smije se ponovno upotrebljavati u testu Prosigna.
5. Odbacite sve reakcije s kompromitiranim vremenima hibridizacije ili temperaturama.
6. Važno je da održavate cjelovitost sljedivosti uzorka (tkivo do RNA i RNA do testa) kako biste jamčili da je identifikacijski broj (ID) uzorka bolesnika povezan s ispravnim rezultatima ispitivanja.
7. Ako reagense ne pohranite prema uvjetima navedenima na naljepnici, to bi moglo negativno utjecati na radni učinak testa.
8. Uvijek nosite rukavice dok rukujete reagensima i uzorcima.
9. Izbjegavajte kontaminaciju RNazom jer to može negativno utjecati na kvalitetu rezultata.

10. Svim biološkim uzorcima i materijalima treba rukovati kao da postoji mogućnost prijenosa zaraznih tvari i treba ih odložiti uz odgovarajuće mjere opreza u skladu sa savezним, državnim i lokalnim propisima.
11. Nikada nemojte pipetirati ustima.
12. Izbjegavajte kontakt reagensa s očima, kožom i sluznicom.
13. Koristite se najboljim praksama molekularnog laboratorija kako biste spriječili prijenos zaraze između testnih uzoraka ili metama nukleinske kiseline visoke koncentracije (sintetički ili umnoženi PCR) koje mogu negativno utjecati na kvalitetu rezultata.
14. Vrlo niske razine natrijeva azida (< 0,1 %) zadržavaju se nakon procesa unutar Prosigna ploča za pripremu i nCounter kasete, stoga se preporučuje da se za odlaganje upotrebljavaju plastični (ne metalni) spremnici za otpad. Iako malo vjerojatno za proizvod Prosigna, poznato je da nakupljanje natrijeva azida na metalima stvara opasnost od eksplozije.
15. Dodatne informacije o odlaganju specifične za uređaj mogu se pronaći u Korisničkom priručniku za sustav za analizu nCounter i servisnim priručnicima za stanicu za pripremu i digitalni analizator.
16. Podatke iz sigurnosno-tehničkog lista za Reporter CodeSet, Capture ProbeSet, pufer za hibridizaciju i ploče za pripremu možete pronaći na adresi www.prosigna.com.
17. Svi opasni materijali trebaju se odložiti u skladu sa smjernicama ustanove za odlaganje opasnog otpada.
18. Sve nekoristene skupove CodeSet treba baciti.
19. Ako je u softver unesena pogrešna kategorija veličine tumora bolesnika, to može negativno utjecati na ROR ocjenu i klasifikaciju rizika (npr. pomaknuta ROR ocjena i/ili pogrešna klasifikacija).
20. Ako je u softver unesen pogrešan status čvora bolesnika, rezultati ispiti- vanja bolesnika mogu biti pogrešni (npr. pogrešna klasifikacija rizika).
21. Nemojte upotrebljavati RNA neodgovarajuće kvalitete ili kvantitete ili uzorke tumora s nedovoljnom površinom tumora ili staničnosti u testu Prosigna. Test Prosigna možda neće dati valjane rezultate i umjesto toga će prikazati test neuspješnim.

5 OPĆENITA RAZMATRANJA O TESTU

1. Test je namijenjen za upotrebu samo na kirurški resekiranim uzorcima tkiva raka dojke fiksiranima u formalinu i uklopljenima u parafin (FFPE) i nije namijenjen za upotrebu na svježem, zamrznutom tkivu ili tkivu koje nije rak dojke.
2. Veličina vidljivog primarnog tumora bolesnika i status čvora potrebni su za izvođenje testa.
3. Upotrebljavajte sterilne nastavke za jednokratnu upotrebu za mikropipete kako biste izbjegli kontaminaciju reagensa ili uzorka mikrobima i nukleazama tijekom obrade.
4. Izolirane uzorka RNA držite na mokrom ledu kada se njima aktivno ne rukuje.
5. Za grijače blokove potrebni su kalibrirani termometri.
6. Nemojte upotrebljavati dijelove kompleta u slučaju da su isporučeni oštećeni.
7. Preporučuje se razvijanje kliničke kontrole (npr. za kategoriju rizika) i upotrebljavanje u laboratorijima koji provode test Prosigna radi osiguranja točnosti rezultata tijekom vremena, kao dio standardnog postupka kontrole kvalitete u laboratoriju.

5.1 Obrada tkiva

1. Ako pravilno ne uklonite okolno netumorsko/zdravo tkivo makrodi- sekcijom tijekom obrade tkiva, može doći do potcjenjivanja rizika zbog niže ROR ocjene prijavljene liječniku.
2. Ako pravilno ne uklonite humani genomski DNA tijekom izoliranja RNA, može doći do više stope pogreške zbog nižeg signala testa ili procjenjivanja rizika zbog više ROR ocjene prijavljene liječniku.
3. Svi neobojeni prerezi tkiva trebaju se montirati na pozitivno nabijena mikroskopska stakalca kako bi se izbjeglo odvajanje tijekom obrade tkiva.
4. Za uzorke koji zahtijevaju više stakalaca, sva stakalca treba obraditi zajedno.
5. Prerezi tkiva montirani na stakalca mogu se razgraditi ako su pohra- njeni dulje od 9 mjeseci u dehidriranom okružju.
6. Kako biste izbjegli kontaminaciju, zamijenite 3 %-tnu radnu otopinu glicerola svaki tjedan ili kada postane zamućena.

7. Promijenite sadržaj prvog pranja D-limonenom nakon obrade skupa od 4 stakalca, a etanol (EtOH) i sadržaj druge posude za bojenje D-limonenom nakon obrade skupa od 8 stakalaca kako biste izbjegli kompromitiranje kvalitete tkiva.
8. Budite oprezni pri označavanju područja tumora na neobojenom stakalcu i uklanjanju netumorskog tkiva kako biste se pobrinuli da se tkivo tumora ne poremeti.
9. Tijekom makrodisekcije pažljivo rukujte oštrim predmetima.
10. Za svaki uzorak tkiva koji se obrađuje uzmite novi žilet.
11. Nove partije/serije kompleta za izolaciju RNA treba ispitati u usporedbi sa specifikacijama kompleta za izolaciju kako bi se partija novog kompleta kvalificirala za ispitivanje uzorka bolesnika (pojednosti pogledajte u odjeljku 11.5).

5.2 Izvođenje testa Prosigna

1. Provjerite je li u softver unesena ispravna kategorija veličine vidljivog primarnog tumora bolesnika.
2. Provjerite je li u softver unesena ispravna kategorija statusa limfnog čvora bolesnika.
3. Provjerite odgovara li grijači blok s grijačem poklopcem potreban za hibridizaciju specifikacijama i je li redovito kalibriran.
4. Upotrebljavajte samo onaj potrošni materijal koji je dostavljen s kompletom Prosigna. Taj je materijal osmišljen posebno za rad s nCounter stanicom za pripremu i nCounter digitalnim analizatorom.
5. Ako je pufer za hibridizaciju pohranjen na niskim temperaturama i opažen je precipitat, zagrijte epruvete na 37 °C dok se soli ne rastvore.
6. Dijelove testa nemojte miješati u vrtložnoj miješalici jer bi se time mogli oštetiti reagensi. Miješanje treba izvoditi pomoću pipete.
7. Nemojte centrifugirati Reporter CodeSet brže od 3.000 × g u trajanju duljem od 10 sekundi. Nemojte upotrijebiti opciju „pulsiranja“ za centri-fugiranje. Ako to učinite, može doći do precipitata u skupu CodeSet.
8. Održavajte reakcije hibridizacije na 65 °C dok ne budu spremne za prijenos u stanicu za pripremu. Postavljanje grijaćeg bloka da se ohladi na 4 °C ili stavljanje uzoraka na led na kraju hibridizacije može rezultirati križnom hibridizacijom ili može ugroziti rezultate testa.
9. Ako ne postavite epruvete u nizu na 65 °C u roku od 15 minuta od dodavanja kompleta Capture ProbeSet, to može rezultirati križnom hibridizacijom koja može ugroziti rezultate testa.
10. Ako ne pokrenete obradu na stanici za pripremu u roku od 15 minuta od uklanjanja uzoraka iz temperature od 65 °C, to može rezultirati križnom hibridizacijom koja može ugroziti rezultate testa.
11. Provjerite jesu li čepovi epruveta u nizu čvrsto zatvoreni prije hibridizacije u grijaćem bloku kako biste spriječili isparavanje, koje može ugroziti rezultate testa.

6 INFORMACIJE O OBUCI

Ovaj je test namijenjen uporabi stručnjacima kvalificiranih za vrlo složene tehnike molekularne biologije na temelju lokalnih propisa. Obratite se tvrtki Veracyte za informacije obuci koja se odnosi na izvođenje testa Prosigna.

7 ODLAGANJE OTPADA

Pojednosti o odlaganju otpada koje se odnose na reagense i uređaje koji se upotrebljavaju za *in vitro* dijagnostičku primjenu pogledajte u korisničkom priručniku sustava za analizu nCounter. Pogledajte upute za upotrebu za odabrani komplet za ekstrakciju RNA za odlaganje otpada i pojednosti specifične za reagense za ekstrakciju RNA.

8 SKLADIŠTENJE I RUKOVANJE (REAGENSI)

Datum isteka valjanosti za sve dijelove kompleta testa naveden je na naljepnici s crtičnim kodom koja se dostavlja u kutiji skupa CodeSet te na oznaci na vanjskom pakiranju za sve dijelove testa Prosigna.

- Dijelove iz kutije Prosigna CodeSet (Prosigna Reporter CodeSet, Prosigna Capture ProbeSet i referentni RNA uzorak Prosigna) treba pohraniti na temperaturi od -80 °C ili niżej.

- nCounter kasete treba pohraniti na temperaturi od -20 °C ili niżej.
- nCounter ploče za pripremu treba pohraniti na temperaturi od 4 °C (2 do 8 °C).
- nCounter dijelove paketa za pripremu treba pohraniti na sobnoj temperaturi, 15 °C – 25 °C.

9 UREĐAJI POTREBNI ZA TEST PROSIGNA

- Sustav za analizu nCounter (kataloški broj NCT-SYST-DX) (uključuje oba uređaja navedena u nastavku)
 - o Stanica za pripremu nCounter 5s (kataloški broj NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - o Digitalni analizator nCounter 5s (kataloški broj NCT-DIGI-TAL-ANALYZER-FLEX)

Dodatne informacije potražite u korisničkom priručniku sustava za analizu nCounter.

10 REAGENSI I OPREMA KOJI SU POTREBNI, ALI NISU ISPORUČENI

10.1 Materijali

1. Komplet za izolaciju FFPE RNA (pogledajte odjeljak 11.5 za zahtjeve o kompletu za izolaciju ako ne upotrebljavate komplet za ekstrakciju RNA Veracyte FFPE koji ste kupili putem tvrtke Veracyte)
2. Hematoksin i eozin (H&E)
3. Pozitivno nabijena staklena mikroskopska stakalca
4. Sredstvo za bistrenje D-limonen (za histologiju)
5. 100 %-tni etanol (apsolutni), ACS razred ili ekvivalentan (najmanje 99,5 %)
6. Glicerol, za molekularnu biologiju
7. Voda bez nukleaze, za molekularnu biologiju*
8. 100 %-tni izopropanol*
9. Konusna tuba od 50 ml
10. Žilet (ili skalpel za jednokratnu upotrebu)
11. Noževi za mikrotom za jednokratnu upotrebu
12. Neprianjajuće tube od 1,5 ili 1,7 ml bez RNaze za mikrocetifugu
13. Nastavci za mikropipete bez RNaze s pregradom protiv aerosola

* Materijali potrebni, no nisu isporučeni za ekstrakciju RNA pomoću kompleta za ekstrakciju RNA Veracyte FFPE.

10.2 Oprema

1. Mikrotom
2. Vodena kupelj (40 °C)
3. Grijač za stakalca (45 °C)
4. Nosač za sušenje mikroskopskih stakalaca
5. Mikropipete; 2 µL, 20 µL, 200 µL i 1000 µL
6. Mini-centrifuga s rotorom za tube u nizu od 0,2 ml i standardnim rotorom za tube od 1,5/2,0 ml za mikrocetifugu
7. Standardna stolna mikrocetifuga s fiksnim kutnim rotorom na koji stanu tube od 1,5 ml za centrifugu
8. Pravokutno stakleno posuđe za bojenje s poklopcima (unutarnje dimenzije približno 3,6 × 2,8 × 2,4" (91 × 71 × 60 mm)); potrebno 3 komada
9. Nosač za stakalca (za najviše deset staklenih stakalaca veličine 3 × 1" (75 × 25 mm))
10. Grijač sa suhim blokom, stacionarni*
11. Stolna vrtložna miješalica za tube za mikrocetifugu
12. Graduirana menzura (preporučena veličina: 100 – 250 ml)
13. Igla za seciranje ili forceps za pokrovno stakalce (pravokutno, nenazubljeno)
14. Kalibrirani termometri (pokrivaju raspon od 55 °C do 80 °C)
15. UV/Vis spektrofotometar za mikrovolumene (pogledajte specifikacije u nastavku)
16. Grijači blok s grijaćim poklopcem (pogledajte specifikacije u nastavku)
17. Centrifuga s pločastim adapterom za mikroploču (pogledajte specifikacije u nastavku)
18. Coplin posuda

* Oprema potrebna za ekstrakciju RNA pomoću kompleta za ekstrakciju RNA Veracyte FFPE.

10.3 Specifikacije opreme

Tablica 1: UV/Vis spektrofotometar punog spektra za mikrovolumen za kvantifikaciju nukleinske kiseline

Značajka dizajna	Specifikacije
Raspon volumena uzorka	1 – 2 µL
Duljina puta	1 mm
Raspon valne duljine	260 – 280 nm
Pogreška ili točnost valne duljine	± 1 nm
Spektralna razlučivost ili pojasna širina	Manje od ili jednako 4 nm
Preciznost apsorpcije ili nasumična pogreška fotometra	0,003 (put od 1 mm)
Granica otkrivanja	5 ng/µL RNA
Maksimalna koncentracija	≥ 1000 ng/µL RNA

Tablica 2: UV- Vis spektrofotometar s fotodiodom za mikrovolumen za kvantifikaciju nukleinske kiseline

Značajka dizajna	Specifikacije
Raspon volumena uzorka	1 – 2 µl
Duljina puta	0,5 mm
Raspon valne duljine	260 i 280 nm
Spektralna razlučivost	Manje od ili jednako 8 nm
Točnost apsorpcije	3 % (pri 1,05 Abs pri 260 nm)
Granica otkrivanja	4 ng/µl RNA
Maksimalna koncentracija	≥ 1000 ng/µl RNA

Tablica 3: Grijači blok s grijaćim poklopcem za hibridizaciju testa

Značajka dizajna	Specifikacije
Dizajn grijaćeg bloka	- Treba odgovarati uobičajenom profilu, udubljena tuba u nizu s 12 jažica od 0,2 ml koja se dostavlja kao dio nCounter paketa za pripremu. - Grijači blokovi dizajnirani za tube niskog profila i visokog profila nisu kompatibilni (nazivaju se i „brzi“ blokovi za termocikliranje) - Grijači blokovi dizajnirani za druge vrste tuba (npr. tube od 0,1 ml, 1,5 ml) nisu kompatibilni - Moraju biti programirani da održavaju temperaturu od 65 °C - Moraju održavati temperaturu unutar ± 1 °C od 65 °C
Dizajn grijaćeg poklopca	- Prihvatljivi su fiksni poklopci ili poklopci s prilagodljivom visinom - Poklopci moraju biti programibilni na 70 °C

Tablica 4: Centrifuga s nosačem mikroploča za vrtnu nCounter ploča za pripremu

Značajka dizajna	Specifikacije
Brzina centrifugiranja	Minimalno 2000 × g
Rotori	4 njihajuća rotora od 750 ml s nosačima za mikroploče (ili ekvivalentni) za smještanje mikroploča s 96 jažica SBS formata
Načini rada	Načini rada ubrzavanja/usporavanja

11 PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORKA

11.1 Zahtjevi za uzorke tkiva i patološki pregled

- Prognostički genski test za rak dojke Prosigna treba provoditi na uzorcima tkiva tumora dojke fiksiranim u formalinu i uklopljenima u parafin, pozitivnim na hormonski receptor koja dalje specifičira patolog kao jedan od sljedećih tipova invazivnog karcinoma dojke:
 - invazivni duktalni karcinom
 - invazivni lobularni karcinom
 - invazivni karcinom s duktalnim i lobularnim značajkama („karcinom miješanog tipa“)
 - nespecificirani tip (NST) ili tip bez posebnih karakteristika (NOS)
- Za ovaj test patolog treba odabrati blok tumora fiksiran u formalinu i uklopljen u parafin s najvećim područjem vijabilnog invazivnog karcinoma dojke.
- Test zahtijeva neobojeno stakalce na koje su montirani prerezi tkiva za obradu i odgovarajuće stakalce obojeno s hematoksilinom i eozinom iz bloka tumora fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin.
- Preporučuje se da se prerezi tkiva za obradu testa izrežu u blizini izrezanog prereza tkiva za bojenje hematoksilinom i eozinom kako bi se osiguralo da tumorsko područje identificirano na stakalcu obojenom hematoksilinom i eozinom predstavlja područje tumora na neobojenim stakalcima.

- Patolog mora zaokružiti područje vijabilnog invazivnog karcinoma dojke na stakalcu s hematoksilinom i eozinom, isključujući okolno netumorsko tkivo.
- Patolog ili educirani laboratorijski tehničar mora procijeniti staničnost tumora i površinu tumora unutar zaokruženog područja na stakalcu obojenom hematoksilinom i eozinom.
 - Postotak staničnosti tumora na stakalcu obojenom eozinom i hematoksilinom mora biti ≥ 10 %
 - Označena površina tumora na stakalcu obojenom eozinom i hematoksilinom mora biti ≥ 4 mm²

* Imajte na umu da se postotak staničnosti tumora odnosi na postotak vijabilnih stanica tumora unutar označenog područja tumora.
- Kao testni unos preporučuje se ukupna površina tumora veća od 100 mm². U sljedećoj je tablici prikazan broj preporučenih stakalaca na temelju izmjerene površine tumora na stakalcu obojenom hematoksilinom i eozinom.
- Ako postupak pregledavanja tkiva pokazuje da blok tumora nema dovoljnu površinu tumora ili dovoljnu staničnost tumora, može se procijeniti drugi blok istog tumora. Ako nema blokova fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin koji sadrže dovoljno tumorskog tkiva, test Prosigna ne smije se pokrenuti. Imajte na umu da je za tumore površine manje od 20 mm² vjerojatnije da neće biti udovoljeno zahtjevima za RNA unos.

Tablica 5: Preporučeni zahtjevi za stakalca na temelju površine tumora

Izmjerena površina tumora na stakalcu obojenom hematoksilinom i eozinom (mm ²)	Broj neobojenih stakalaca
4 – 19	6
20 – 99	3
≥ 100	1

11.2 Prikupljanje i pohrana uzoraka

- Sljedeće se može izvršiti u skladu sa standardnim radnim postupcima laboratorija: prikupljanje tkiva i fiksiranje u formalinu, rukovanje blokom tumora fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin te pohrana i otprema FFPE tkiva montiranog na stakalce.
- Stakalce na koje su montirani prerezi FFPE tkiva mora se pohraniti u skladu sa standardnim radnim postupcima laboratorija. Ako pohra- njujete na dulje razdoblje (više od 30 dana), stakalca treba pohraniti u dehidriranoj okolini i obraditi ih unutar 9 mjeseci kako bi se osigurala kvaliteta rezultata ispitivanja.

11.3 Priprema stakalca

- Pomoću mikrotoma izrežite prerez debljine 4 do 5 µm za bojenje hematoksilinom i eozinom.
- Pomoću mikrotoma izrežite prerez debljine 10 µm za upotrebu u testu Prosigna.
- Neka prerezi plutaju u vodenj kupelji na 40 °C.
- Prereze montirajte na pozitivno nabijena staklena mikroskopska stakalca.
- Neka se stakalca suše na zraku.
- Stakalca zagrijavajte preko noći na 45 °C.

11.4 Obrada stakalca

- Pripremite 3 %-tnu radnu otopinu glicerola tako da pomiješate 1,5 ml glicerola s 48,5 ml vode bez nukleaze za molekularnu upotrebu; skalirajte prema potrebi. Otopinu ulijte u Coplin posudu za obradu stakalaca.
- Ulijte približno 200 do 250 ml sredstva za bistrenje D-limonen u dvije posude za bojenje, pazeći da su stakalca na nosaču za stakalca u potpunosti uronjena.
- Ulijte približno 200 do 250 ml apsolutnog etanola (EtOH) u treću posudu za bojenje.
- Neobojene prereze tkiva montirane na stakalca stavite u nosač za stakalca.
- Nosač za stakalca postavite u prvu posudu za bojenje s D-limo- nenom i nježno tresite nosač za stakalca naprijed i natrag u trajanju od 10 do 15 sekundi. Neka stalak oстане u prvoj posudi za bojenje s D-limonenom ukupno 2 minute.

- Nosač za stakalca premjestite iz prve posude s D-limonenom u drugu posudu s D-limonenom. Nježno tresite nosač za stakalca naprijed i natrag u trajanju od 10 do 15 sekundi. Neka nosač za stakalca ostane u prvoj posudi za bojenje s D-limonenom ukupno 2 minute. Uvjerite se da je uklonjen sav parafin. U suprotnom, nosač ostavite u drugoj posudi za bojenje s D-limonenom oko 1 minutu dulje.
 - Nosač za stakalca premjestite iz druge posude za bojenje s D-limonenom u otopinu EtOH za ispiranje. Nježno tresite nosač za stakalca naprijed i natrag u trajanju od 10 do 15 sekundi i izvadite ga nakon 2 minute.
 - Neka se stakalca suše na zraku 5 do 10 minuta ili dok nisu u potpunosti suha i tkivo izgleda bijelo (to može potrajati dulje ovisno o veličini tkiva).
 - Označite područje tumora na stražnjoj strani neobojenog stakalca tako da ga poravnate s odgovarajućim stakalcem obojenim hematoksilinom i eozinom i prenesete označeno područje.
 - Radite s jednim stakalcem odjednom, rehidrirajte tkivo na označenom neobojenom stakalcu tako da stakalce uronite u otopinu 3 %-tnog glicerola.
 - Uklonite višak glicerola sa stakalca pomoću laboratorijske maramice.
 - Pri obradi više stakalaca korisnik može dopustiti da se stakalca osuše na nosaču za sušenje dok se ostala stakalca rehidriraju.
 - Žiletom ili skalpelom ostružite netumorsko tkivo koje se nalazi oko označenog područja tumora te ga bacite.
 - Dok držite jednu stranu stakalca i drugu ste položili na čvrstu površinu pod kutom od 45 stupnjeva, prikupite makrodisecirano tkivo tumora na rub žileta. Tkivo se lako može „uviti“ na žilet dok se prikuplja.
 - Ponovite prethodni korak za svako stakalce iz istog uzorka.
- Napomena:** Više neobojenih stakalca iz istog FFPE uzorka može se prikupiti na isti žilet.
- Prereze tkiva iz istog uzorka nježno ubacite u označenu tubu od 1,5 ml za mikrocentrifugu.
 - Ako se upotrebljava, očistite iglu za seciranje ili forceps tako da ih uronite u D-limonen na nekoliko sekundi i osušite između uzoraka tkiva.

11.5 Izoliranje RNA

Veracety preporučuje upotrebu kompleta za ekstrakciju RNA Veracety FFPE Extraction Kit, koji je validiran posebno za upotrebu s testom Prosigna.

Drugi kompleti za izolaciju RNA mogu se upotrebljavati za pripremu uzoraka za test Prosigna ako daju RNA iz prereza tkiva tumora dojke fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin te montiranih na stakalca koji udovoljavaju sljedećim specifikacijama:

Tablica 6: Specifikacije kompleta za izoliranje RNA

Metrički	Test ili mjerenje	Specifikacija
Koncentracija RNA	Optička gustoća pri 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ l
Ukupni volumen RNA (μ l)	Ukupni eluirani volumen	≥ 12 μ l
Čistoća RNA	Omjer optičke gustoće pri 260 nm s optičkom gustoćom pri 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7 – 2,3
Kontaminacija DNA	Sadržaj genomske DNA u eluiranom uzorku RNA	≤ 1 ng/ μ l
Cjelovitost RNA	Raspodjela veličine izoliranih RNA fragmenata	≥ 90 % izoliranih RNA fragmenata mora biti ≥ 100 nukleotida u dužini

Oprez: ako se u kombinaciji s testom Prosigna koristi alternativni postupak izolacije, laboratorij mora u potpunosti validirati taj posebni radni tijek prije njegove rutinske provedbe.

Postupak izoliranja RNA:

- Ako se koristi komplet za ekstrakciju RNA Veracety FFPE Extraction Kit, pridržavajte se uputa za upotrebu tvrtke Veracety.
- Ako se koristi alternativna metoda ekstrakcije, pridržavajte se provjerenog postupka ili postupka koji je naveo proizvođač.

Svaka serija kompleta za ekstrakciju RNA koju proizvodi Veracety kvalificirana je za proizvodnju uzoraka RNA koji ispunjavaju prethodno definirane specifikacije za testove za dijagnostičku ekspresiju gena. Pogledajte list s metodama za odabrani komplet za ekstrakciju RNA/upute za upotrebu u kojima možete pronaći upute za skladištenje, sigurnost i rukovanje.

11.6 Mjerenje koncentracije i kvalitete RNA

- Izmjerite koncentraciju izolirane RNA unutar istog radnog dana (pohranite na +2 do +8 °C) ili zamrznite na temperaturi od -70 °C ili nižoj do upotrebe.
- Izmjerite optičku gustoću (OD) 2 μ l izolirane RNA pri 260 i 280 nm koristeći se spektrofotometrom koji udovoljava definiranim specifikacijama navedenima u odjeljku 10.3 Specifikacije opreme. Izbjegavajte pipetiranje volumena od 2 μ l s dna izvorne epruvete u slučaju da je preostalo staklenih vlakana što može nepovoljno utjecati na očitavanje optičke gustoće.
- Slijedite upute proizvođača spektrofotometra za mjerenje RNA.
- Ako neki od uzoraka ne udovoljava minimalnim pokazateljima čistoće RNA ili koncentracije (Tablica 6), centrifugirajte epruvetu s uzorkom u trajanju od 1 minute pri maksimalnoj brzini ($> 10000 \times g$), postavite epruvetu na led i ponovite postupak mjerenja. Ako uzorak i dalje ne udovoljava pokazateljima čistoće ili koncentracije, RNA uzorak nije pogodan za analizu prema postupku testa Prosigna. Nemojte upotrebljavati RNA kvalitete ili kvantitete nedostatne za test Prosigna.
- Ekstrakcija RNA može se ponoviti ako nije udovoljeno minimalnim specifikacijama koncentracije ili čistoće (Tablica 6). Korisnici mogu odabrati izolirati dodatna stakalca iz istog FFPE bloka ili odabrati zaseban blok istog bolesnika.
- Ako koncentracija RNA premaši 250 ng/ μ l, treba je razgraditi s RNazom za molekularnu upotrebu i vodom bez DNaze u ciljnoj koncentraciji od 200 ng/ μ l prije izvođenja testa nizvodne hibridizacije. Upotrijebite zabilježeni rezultat omjera OD 260/280 iz nerazrijeđenog uzorka kako biste odredili udovoljava li razrijeđeni uzorak minimalnoj čistoći RNA od 1,7.
- Zamrznite RNA na temperaturi od -70 °C ili nižoj ako test Prosigna ne možete dovršiti unutar istog radnog dana.

11.7 Postupak testa

Ovaj postupak testa opisuje korake potrebne za izvođenje testa Prosigna uz upotrebu sustava za analizu nCounter. Ti se koraci mogu sažeti u nekoliko sljedećih kategorija u dva uzastopna dana:

Prvi dan

- Postavljanje zapisa o identifikaciji skupa ciklusa (RSID) u internetskoj aplikaciji
- Postavljanje hibridizacije RNA pomoću skupa Prosigna CodeSet (postavljanje od 30 minuta, hibridizacija od 15 do 21 sat)

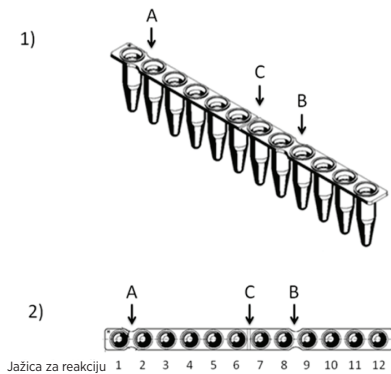
Drugi dan

- Postavljanje i pokretanje stanice za pripremu (postavljanje od 20 minuta, 2 do 3 sata po ciklusu, ovisno o broju uzoraka koji se analiziraju)
- Postavljanje i skeniranje kasete na digitalnom analizatoru (5 minuta za postavljanje, 2,5 do 4,5 sati za svaku kasetu, ovisno o broju uzoraka koji se analiziraju)
- Dohvaćanje izvješća (30 minuta)

Odabir uzorka bolesnika i postavljanje serije

- Određivanje uzoraka bolesnika koji će biti dijelom ciklusa ispitivanja. U pojedinu seriju može se uključiti najviše 10 uzoraka
 - Svakom uzorku unutar serije bit će dodijeljen jedinstveni položaj unutar epruvete u nizu s 12 jažica koja se upotrebljava za hibridizaciju, a registrira se kao dio ID skupa ciklusa na uređaju (ID skupa ciklusa izvršen putem softvera internetske aplikacije). Imajte na umu da su položaji 1 i 2 rezervirani za referentni uzorak, a položaji od 3 do 12 su za RNA uzorke tumora.
 - Ilustracija u nastavku prikazuje bočni 1) i gornji prikaz 2) epruvete u nizu. Epruveta u nizu asimetrično je udubljena između jažica za reakciju 1 i 2 (A) te 8 i 9 (B) kao pomoć u održavanju redoslijeda uzorka tijekom obrade. Epruveta u nizu također je urezana između jažica za reakciju 6 i 7 (C) kako bi se olakšalo rezanje epruvete u nizu ako bude potrebno postaviti standardne adaptore za centrifugu.

Slika 6: Ilustracija udubljene epruvete u nizu



2. Izračunajte količinu RNA i vode (kada je potrebno) koje treba dodati u reakciju hibridizacije za svaki uzorak unutar serije.
 - a. Preporučeni RNA unos je 250 ng za test. Prihvatljivi raspon RNA unosa za hibridizaciju je 125 – 500 ng.
 - b. Izračunajte volumen (u mikrolitrima) RNA uzorka koji treba dodati u reakciju hibridizacije dijeljenjem željenog unosa uzorka (npr., 250 ng) izmjerenom koncentracijom.
 - c. Ako je izračunata koncentracija uzorka između 12,5 ng/μl i 25 ng/μl, dodajte maksimalnu količinu od 10 μl.
 - d. Za uzorke kojima treba manje od 10 μl izračunajte volumen vode potreban za dobivanje ukupno 10 μl volumena uzorka.

Primjer: Za uzorak s izmjerenom koncentracijom RNA od 85 ng/μl, potrebno je 2,9 μl uzorka za ukupnu masu od 250 ng i potrebno je 7,1 μl vode kako bi volumen bio 10 μl prije dodavanja preostalih reagensa. U jednakžbi: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Registracija i obrada uzorka

Korisnik će stvoriti jedinstveni ID skupa ciklusa za svaku seriju uzoraka povezujući ID broj uzorka s lokacijom na epruveti u nizu (položaji 3 do 12) uz upotrebu internetske aplikacije sustava za analizu nCounter. Upute o upotrebi internetske aplikacije sustava za analizu nCounter korisnik može pronaći u korisničkom priručniku.

1. Ako je uzorak RNA bio zamrznut prije upotrebe, izvršite sljedeće korake prije nastavka:
 - a. U potpunosti otopite uzorak RNA i pohranite ga na ledu.
 - b. Centrifugirajte otoplenu epruvetu s uzorkom u trajanju od 1 minute pri maksimalnoj brzini ($> 10000 \times g$) i postavite natrag na led.
2. Odaberite odgovarajuću veličinu kompleta testa Prosigna na temelju broja uzoraka bolesnika koji se testiraju (2, 3, 4 ili 10). Izvadite epruvetu svakog od sljedećih reagensa iz kompleta CodeSet iz zamrzivača na -80°C da se otope. Reagense pohranite na ledu ako nećete odmah nastaviti sa sljedećim koracima.
 - a. Prosigna Reporter CodeSet (zelena naljepnica na čepu)
 - b. Prosigna Capture ProbeSet (siva naljepnica na čepu)
 - c. Prosigna referentni uzorak (nema naljepnice na čepu)
3. Uklonite naljepnicu s crtičnim kodom partije skupa CodeSet i šifru konfiguracije testa iz kutije CodeSet.
4. U internetskom pregledniku prijavite se u internetsku aplikaciju IVD sustava za analizu nCounter i odaberite Prosigna kao vrstu testa kako biste započeli postavljanje obrazaca za digitalnu registraciju.
5. Na glavnoj stranici odaberite „Create New Run Set“ (Stvori novi skup ciklusa).
6. Prvo obavezno polje pri definiranju serije Prosigna je Run Set ID (ID skupa ciklusa). Unesite jedinstveni identifikator u polje Run Set ID (ID skupa ciklusa) kako biste identificirali seriju uzoraka.
7. Skenirajte ili ručno unesite šifru konfiguracije testa u internetsku aplikaciju. Nakon što je skenirate ili unesete, možete je baciti.
8. Skenirajte ili ručno unesite šifru kompleta CodeSet u internetsku aplikaciju.
9. Zatim u odgovarajuće polje za ID uzorka unesite jedinstveni ID uzorka za uzorak koji će se nalaziti na trećem položaju/jažici na epruveti u nizu.

- a. Unesite ID uzorka RNA bolesnika pomoću skenera crtičnog koda ili ručno unoseći ID uzorka pomoću tipkovnice.
- b. Nakon unosa ID broja svakog uzorka i prije unosa sljedećeg uzorka tabulatorom priđite u odgovarajuća padajuća polja kako biste ih popunili (veličina tumora i status čvora).
 - i. Upotrijebite broj pozitivnih čvorova koji je ustanovljen tijekom patohistološke procjene bolesnika kako biste odabrali odgovarajuću kategoriju čvora za test (nula, 1 – 3, ≥ 4).
 - ii. Upotrijebite izmjerenu veličinu vidljivog tumora ili stadij koji je određen tijekom patohistološke procjene bolesnika kako biste odabrali odgovarajuću kategoriju veličine vidljivog tumora za test ($\leq 2 \text{ cm}$ ili $> 2 \text{ cm}$).
- c. Komentare možete unijeti u dodatno polje Memo (Komentar) za svaki uzorak.

Napomena: Ako nisu potrebni neki položaji/jažice na epruveti u nizu, ostavite preostala polja praznima. Ako su potrebna dodatna polja za više uzoraka, upotrijebite razne konfiguracije testa koji mogu prihvatiti više uzoraka.

10. Nakon što dovršite unos uzorka, specificirajte koji korisnici će primiti sljedeće:
 - a. Ažuriranja statusa za analize provedene na stanici za pripremu i digitalnom analizatoru.
 - b. Obavijest da je dostupno završno izvješće.
11. Spremite dovršeni skup ciklusa.
 - a. Radni list skupa ciklusa možete ispisati i upotrijebiti u svrhu sljedivosti i verifikacije uzorka.

Postupak reakcije hibridizacije

Napomena: Za sljedeće korake pretpostavlja se upotrebljava deset (10) uzoraka bolesnika i dva (2) referentna uzorka.

Napomena: Nemojte centrifugirati Reporter CodeSet brže od $3000 \times g$ ili dulje od 10 sekundi i nemojte „pulsirati“ vrtnju. Ako to učinite, centrifuga će doseći maksimalnu brzinu i može vrtnjom izbaciti otopinu iz skupa CodeSet.

1. Programirajte grijači blok koristeći se količinom od 30 μl, izračunatom temperaturom bloka i poklopca te postavkom vremena „zauvijek“ (ili ekvivalentna postavka vremena zadržavanja). Temperaturom grijačeg bloka postavite na 65°C i temperaturu grijačeg poklopca postavite na 70°C .

Napomena: Za sljedeće korake iznimno je važno da održavate redoslijed kojim se uzorci dodaju u epruvete u nizu, pazeći da redoslijed odgovara onom na ID-u skupa ciklusa.

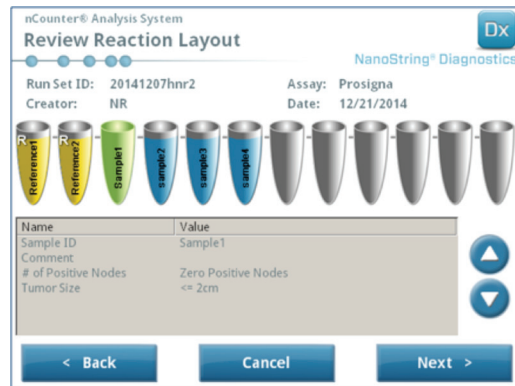
2. Označite dostavljenu udubljenu epruvetu u nizu s 12 jažica kako biste razlikovali položaje od 1 do 6 od položaja od 7 do 12 (pogledajte ilustraciju epruvete u nizu).
3. Ako je potrebno, odrežite epruvetu u nizu napola kako bi pristajala u mini centrifugu s adapterom za epruvetu u nizu.
4. Pipetirajte 10 μl referentnog uzorka na položaje 1 i 2 na udubljenoj epruveti u nizu.
5. Pipetirajte izračunati volumen vode potreban za svaki uzorak u pripadajućim položajima na udubljenoj epruveti u nizu.
6. Pipetirajte izračunati volumen RNA potreban za svaki uzorak u pripadajućim položajima na udubljenoj epruveti u nizu koristeći se novim nastavkom pipete za svaki uzorak.
7. Kada je uzorak bolesnika dodan u epruvetu u nizu, preporučuje se postaviti epruvetu za uzorak u nosač za epruvete za uzorak, održavajući redoslijed kojim je uzorak dodan u epruvetu u nizu. To služi za provjeru da su uzorci dodani namijenjenim redoslijedom nakon što su svi uzorci dodani u epruvetu u nizu.
8. Kada su svi uzorci dodani u epruvetu u nizu, provjerite je li isti redoslijed uzoraka zadržan u epruveti u nizu (radni list skupa ciklusa može se upotrijebiti za provjeru redoslijeda uzorka).
 - a. Ako je potrebno, uredite ID skupa ciklusa pomoću softvera internetske aplikacije kako bi odražavao redoslijed uzorka u konačnom rasporedu (pogledajte korisnički priručnik sustava za analizu nCounter za upute o uređivanju postojećeg ID-a skupa ciklusa).
9. Nakon što je provjeren redoslijed uzorka, pojedinačne epruvete s RNA uzorkom postavite natrag na led.

10. Stvorite glavnu mješavinu koja sadrži 130 µl pufera za hibridizaciju i 65 µl skupa Reporter CodeSet.
Napomena: Ako je Reporter CodeSet bio pohranjen na ledu, neka se uravnoteži na sobnu temperaturu najmanje 1 minutu prije nego što dodate pufer za hibridizaciju.
11. Izmiješajte pipetiranjem i nakratko centrifugirajte glavnu mješavinu.
Napomena: Glavnu mješavinu nemojte staviti na led.
12. Pipetirajte 15 µl glavne mješavine u svaku od 12 jažica. Za svaku jažicu upotrijebite novi nastavak pipete.
Napomena: Nakon što dovršite **sljedeći** korak, epruveta u nizu mora se postaviti u grijači blok na 65 °C u roku od 15 minuta.
13. Dodajte 5 µl Capture ProbeSet u svaku jažicu koristeći se novim nastavkom za pipetu za svaku jažicu.
14. Začepite jažice na epruveti u nizu i izmiješajte reagense preokretanjem epruvete u nizu nekoliko puta i laganim udaranjem prstom kako biste se uvjerali da je potpuno izmiješano.
15. Uzorke u epruveti u nizu nakratko centrifugirajte u centrifugi PicoFuge ili mini centrifugi (pri < 3000 × g).
Napomena: Upotrijebite centrifugu PicoFuge u koju se može smjestiti epruveta u nizu s 12 jažica ili ako je potrebno mini centrifugu u koju se mogu smjestiti prerezane epruvete u nizu.
16. Epruvete u nizu postavite u grijači blok s grijačim poklopcem na temperaturu od 65 °C. Testove za hibridizaciju inkubirajte na 65 °C tijekom 15 do 21 sati. Hibridizaciju treba ostaviti na 65 °C dok nije spremna za obradu na stanici za pripremu.
Napomena: Bacite nekorišteni CodeSet.

Obrada uzoraka na stanici za pripremu nCounter

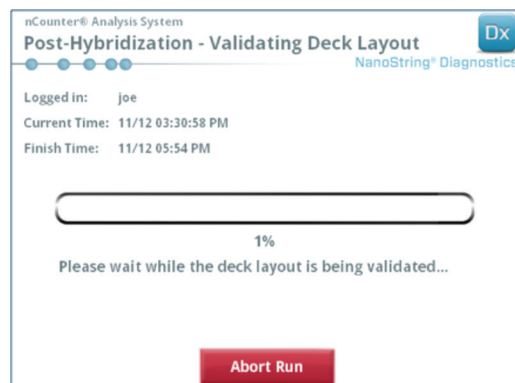
1. Pronađite stanicu za pripremu koja je povezana s digitalnim analizatorom.
2. Izvadite kasetu nCounter iz pohrane na -20 °C i ostavite je da se uravnoteži na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta u vrećici od folije.
Napomena: Provjerite jesu li zajedno korištene komponente iz iste partije kompleta.
3. Kada kasetu dostigne sobnu temperaturu, izvadite je iz vrećice od folije prije nego što kasetu postavite na platformu stanice za pripremu.
4. Izvadite ploče za pripremu nCounter iz pohrane na 4 °C i ostavite ih da se uravnoteže na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta. **Napomena:** Za cikluse koji se izvode s kompletom 2, 3 ili 4 testa Prosigna potrebna je samo jedna ploča za pripremu.
5. Ploče za pripremu centrifugirajte na 2000 × g u trajanju od 2 minute kako bi se tekućine skupile pri dnu jažice prije nego što ploče za pripremu postavite na platformu stanice za pripremu.
6. Dok se kasete i ploče za pripremu uravnotežuju na sobnu temperaturu, pripremite stanicu za pripremu s potrošnim materijalima iz paketa za pripremu nCounter.
7. Na sučelju dodirnog zaslona stanice za pripremu nCounter odaberite gumb „Diagnostics” (Dijagnostika) za svoj test.
8. Na zaslonu Main Menu (Glavni izbornik) odaberite gumb „Process Samples” (Obrada uzoraka) na sučelju dodirnog zaslona.
9. Pregledajte popis dostupnih ID brojeva skupa ciklusa (RSID) ilustriranih na zaslonu kako biste potvrdili RSID za uzorke koji se trenutno obrađuju.
10. Odaberite RSID dodirivanjem zaslona i odabirom „Next” (Dalje) na sučelju dodirnog zaslona.
11. Na sučelju dodirnog zaslona provjerite je li odabran odgovarajući RSID tako da pogledate svaku epruvetu na zaslonu i usporedite podatke o uzorku.
 - a. Radni list skupa ciklusa možete ovdje upotrijebiti u svrhu sljedivosti i verifikacije uzorka.
 - b. Ako je odabran neodgovarajući RSID, dodirnite gumb „Back” (Natrag) i odaberite ispravan RSID.
 - c. Ako je RSID bio točan, ali postoje pogreške o unosu uzorka, dodirnite gumb „Back” (Natrag) i idite na računalo te uredite RSID putem internetske aplikacije.

Slika 7: Zaslon obrade ciklusa na stanici za pripremu



12. Na sljedećih nekoliko zaslona vidjet ćete obavijesti da skenirate zatražene ID brojeve crtičnog koda reagensa u otvorenom poljima ili da potvrdite postavljanje potrebnog potrošnog materijala na platformu. Nakon što izvršite svaki zadatak, odaberite „Next” (Dalje) na sučelju dodirnog zaslona i prijedite na sljedeću obavijest.
Napomena: Za cikluse koji se izvode s kompletom Prosigna za 2, 3 ili 4 testa potrebna je samo jedna ploča za pripremu i jedna prazna epruveta u nizu za grijač. Za cikluse s kompletom za 2, 3 ili 4 testa postavite ploču za pripremu i praznu epruvetu u nizu za grijač u pripadajuće prednje položaje (najbliže korisniku) na platformi stanice za pripremu.
13. Uklonite uzorke iz grijaćeg bloka.
Napomena: Pokrenite ciklus na stanici za pripremu unutar 15 minuta od vađenja uzoraka iz grijaćeg bloka.
14. Postavite epruvetu u nizu u centrifugu PicoFuge ili mini centrifugu i nakratko centrifugirajte (pri < 3000 × g).
15. Nježno uklonite čepove za epruvete s epruvete u nizu.
16. Utorite epruvetu u nizu i vodilice na stanici za pripremu trebaju ostati u ispravnom redoslijedu i orijentaciji za uzorke.
17. Epruvete u nizu s jažicama redoslijedom od 1 do 12 slijeva nadesno stavite na platformu stanice za pripremu nCounter. Pri izvođenju ciklusa pomoću kompleta za 2, 3 ili 4 testa, samo prvu polovicu epruvete u nizu (jažice 1 do 6) treba postaviti na lijevu stranu držača epruveta za uzorak na platformi kada je to primjenjivo. Imajte na umu da je važno upotrijebiti samo jažice od 1 do 6. Druga polovica epruvete u nizu (jažice 7 do 12) neće stati na lijevu polovicu držača zbog udubljenog dizajna epruvete.
18. Potvrdite da su epruvete u nizu čvrsto sjele na stanicu za pripremu i zatvorite metalni poklopac.
19. Ako se poklopac ne zatvori pravilno, tijekom validacije rasporeda platforme vidjet ćete obavijest da ga zatvorite.
20. Na sučelju dodirnog zaslona odaberite „Next” (Dalje).
21. Zatvorite vrata uređaja kada vidite obavijest i odaberite „Next” (Dalje) kako biste započeli s validacijom rasporeda platforme.
22. Dođe li do pogreške, slijedite upute povezane sa specifičnom pogreškom kako biste nastavili s validacijom rasporeda platforme.

Slika 8: Validacija rasporeda platforme nakon hibridizacije na stanici za pripremu



23. Nakon što je raspored platforme validiran, na sučelju dodirnog zaslona odaberite „Start Processing“ (Započni obradu).
- Napomena:** Nайдете li na probleme s pokretanjem stanice za pripremu, uzorke za hibridizaciju vratite u grijači blok, ali nemojte prekoračiti maksimalno vrijeme od 21 sata.
24. Slijedite upute na stanici za pripremu nakon što se ciklus dovrši.
25. Kada stanica za pripremu dovrši ciklus, pažljivo izvadite kasetu iz stanice za pripremu i zatvorite jažice na kaseti s dostavljenim ljepljivim poklopcem za jažice na kaseti.
- Napomena:** Nemojte dopustiti da kasete ostanе otvorene u stanici za pripremu preko ноći.
26. Ako неćете skenirati uzorke unutar istog dana, kasetu pohranite na 4 °C u neprozirnoj kutiji, najviše 1 tјedan.

Skeniranje kasete na digitalnom analizatoru nCounter

- Pronađite digitalni analizator koji je povezan sa stanicom za pripremu koja je obradila uzorke. Kasetu postavite u digitalni analizator nCounter radi skeniranja.
 - Otvorite vrata digitalnog analizatora.
 - U prazno ležište postavite kasetu koju treba dodati.
 - Zatvorite vrata i pogledajte dodirni zaslon.
 - Sučelje dodirnog zaslona na digitalnom analizatoru ima nekoliko grafičkih prikaza koji vam pomažu da brzo prepoznate status položaja:
 - Prazna lokacija: To je ležište prazno i spremno da se na njega stavi nova kasete.
 - Popunjena plava kasete: dovršeno skeniranje.
- NEMOJTE UKLONITI SLJEDEĆE KASETE:**
- Bijela kasete: to ležište sadrži kasetu koja je registrirana, ali nije skenirana.
 - Djelomično plava kasete: to ležište sadrži kasetu koja je u postupku skeniranja
- Kasete za koje je završeno skeniranje mogu se izvaditi iz digitalnog analizatora.
 - Ako je to prva umetnuta kasete na digitalnom analizatoru, dodirnite gumb „Diagnostics“ (Dijagnostika) i odaberite „Main Menu“ (Glavni izbornik) kako biste se prijavili u digitalni analizator. Ako digitalni analizator već skenira kasete, nastavite na 9. korak u nastavku.
 - Pažljivo postavite kasetu u prazno ležište (pogledajte smjernice za status pozicioniranja gore) na digitalnom analizatoru. Ležište i kasete su udubljeni kako bi vam pomogli da zadržite pravilno usmjerenje. Crtični kod će gledati gore.
 - Spustite poklopac ležišta i pritisnite kasetu kroz otvor u poklopcu ležišta kao biste se uvjerali da je kasete pravilno sjela.
 - Dodirnite gumb Start Counting (Započni brojenje) i pričekajte da skener započne postupak skeniranja. Čut ćete seriju malih ritmičkih škljocaja kako digitalni analizator započne sa skeniranjem kasete.
 - Provjerite je li se plava traka prikazala na položaju kasete na zaslonu (u roku od pet minuta od početka skeniranja), što pokazuje da je skeniranje započelo.
 - Kako biste dodali kasetu u digitalni analizator koji već skenira kasete, dodirnite „Pause“ (Pauza) na zaslonu Counting Cartridges (Brojenje kasete) i pričekajte da digitalni analizator pauzira trenutačno skeniranje.
 - Otvorite vrata digitalnog analizatora.
 - Postavite kasete koje treba dodati na prazno ležište (pogledajte smjernice za status pozicioniranja gore).
 - Zatvorite vrata i dodirnite „Resume“ (Nastavi).
 - Kada skeniranje završi, softver će poslati izvješće na prethodno specificirane korisničke a-adrese.
 - Nakon primitka obavijesti putem e-pošte, uklonite dovršene kasete i bacite ih sukladno sa smjernicama vaše ustanove.

Napomena: Izvješća će se generirati za uspješno dovršene cikluse kao i za cikluse s pogreškama koji su povezane s kontrolom kvalitete podataka. Izvješća se neće generirati u slučaju pogreške koja nije povezana s kontrolom kvalitete podataka. Ako do toga dođe, pomoć zatražite od službe za korisničku podršku tvrtke Veracite.

- Upotrijebite poveznicu koja se nalazi u toj poruci e-pošte kako biste otvorili internetsku aplikaciju i preuzeli sva izvješća o testu povezana s RSID-om koji se trenutačno obrađuje.
- Nakon pogreške: Pridržavajte se preporuke navedene u izvješću o testu za pojedinačni uzorak ili pogreške sustava.

Napomena: Pogreške pojedinačnih uzoraka ne smatraju se pogreškama sustava.

12 RJEŠAVANJE PROBLEMA I POGREŠKE TESTA

Tablica 7: Šifre pogreški za ponavljanje testa

Šifra pogreške	Opis pogreške	Preporučena radnja
5	Pogreška skeniranja	Ponovno obradite uzorak s RNA od 250 ng
7	Visok signal	Ponovno specificirajte uzorak i ponovite testiranje s RNA od 125 ng
6	Nizak signal	Ponovno specificirajte uzorak i ponovite testiranje s RNA od 500 ng
30	Nizak signal	Ponovno specificirajte uzorak i ponovite testiranje s RNA od 500 ng
31	Nizak RNA signal	Ponovno specificirajte uzorak i ponovite testiranje s RNA od 500 ng

Razlozi za ponavljanje testa:

- Izvještaj o testu identificirat će uzorke s pogreškom i neće prijaviti rezultate testa. Rezultati testa bit će prijavljeni u slučaju uzoraka koji su uspješno analizirani.
- Izvještaj o testu identificirat će vrstu pogreške i preporučene radnje u slučaju pogreške testa. Koncentracija RNA uzoraka koji nisu uspješno analizirani može se ponovno izmjeriti i uzroci se mogu ponovno obraditi (kao dio nove serije/RSID) ovisno o vrsti pogreške i količini mase RNA koja je ostala radi dobivanja rezultata testa.

13 REZULTATI TESTA

Test Prosigna uključuje seriju pokazatelja kontrole kvalitete koji se automatski primjenjuju na svaki uzorak tijekom analize. Ti pokazatelji procjenjuju izvođenje testa kako bi se utvrdilo jesu li rezultati unutar očekivanih vrijednosti. Nakon uspješne analize tih pokazatelja kontrole kvalitete, test Prosigna daje sljedeće rezultate:

Tablica 8: Rezultati i izlazne vrijednosti testa Prosigna

Rezultat	Izlazne vrijednosti
Intrinzični podtip uzorka raka dojke	Luminalni A Luminalni B HER2-enriched Nalik bazalnom
Pojedinačna procjena vjerojatnosti udaljenog recidiva unutar 10 godina	0 – 100 %
Ocjena rizika od ponavljanja bolesti (ROR)	Vrijednost u cijelom broju na ljestvici od 0 do 100
Kategorija rizika	Nizak, srednji, visok

13.1 Intrinzični podtipovi

Pokazano je da je intrinzični podtip tumora raka dojke povezan s prognozom raka dojke u ranom stadiju. Prosječno, bolesnici s luminalnim A tumorom imaju značajno bolji ishod od bolesnika s luminalnim B tumorom, HER2-enriched ili tumorom nalik bazalnom^{2,5}.

Intrinzični podtip identificira se usporedbom profila ekspresije gena od 50 gena u nepoznatom uzorku s profilima očekivane ekspresije za četiri intrinzična podtipa. Nepoznatom se uzorku dodjeljuje podtip s najsličnijim profilom.

Najčešći podtipovi raka dojke su luminalni podtipovi, luminalni A (LumA) i luminalni B (LumB). Prethodna ispitivanja ukazuju na to da luminalni A čini približno 30 % do 40 %, a luminalni B čini približno 20 % raka dojke⁵. Međutim, više od 90 % bolesnika s pozitivnim hormonskim receptorom ima Luminalne tumore. Obrazac ekspresije gena tih podtipova nalikuje Luminalnoj epitelnoj komponenti tkiva dojke⁵. Ti su tumori karakterizirani visokom ekspresijom estrogenog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR) i gena povezanih s aktivacijom ER-a kao što je LIV1, GATA3 i ciklin D1, te ekspresijom luminalnih citokeratina 8 i 18. Luminalni A rak dojke pokazuje nižu ekspresiju gena povezanu s aktivacijom staničnog ciklusa kada se uspoređuje s luminalnim B rakom dojke, što rezultira boljom prognozom.

Prethodna ispitivanja ukazuju na to da HER2-enriched podtip (HER2-E) čini približno 20 % raka dojke⁵. Međutim, HER2-enriched tumori općenito su negativni na ER pa je tako utvrđeno da samo 5 % testirane populacije bolesnika koji su pozitivni na ER ima rak dojke HER2-enriched. Bez obzira na status ER, HER2-enriched tumori u većini su slučajeva pozitivni na HER2 s visokom ekspresijom nakupine ERBB2, uključujući ERBB2 i GRB7. Geni povezani s aktivacijom staničnog ciklusa također su visoko ekspresirani.

Objavljeni podaci ukazuju na to da podtip nalik bazalnom čini približno 20 % raka dojke⁵. Međutim, tumori nalik bazalnom općenito su negativni na ER, pa samo 1 % bolesnika s pozitivnim hormonskim receptorom ima tumor dojke nalik bazalnom. Podtip nalik bazalnom gotovo je uvijek klinički negativan na HER2 i ekspirira svitu „bazalnih“ biomarkera uključujući citokeratine (CK) bazalnog epitela i receptor čimbenika epidermalnog rasta (EGFR). Geni povezani s aktivacijom staničnog ciklusa visoko su ekspimirani.

13.2 ROR ocjena

ROR ocjena je vrijednost u cijelom broju na ljestvici od 0 do 100 koja je povezana s vjerojatnošću pojedinog bolesnika za udaljeni recidiv unutar 10 godina za definiranu populaciju za koju je namijenjena. ROR ocjena izračunava se usporedbom profila ekspresije 46 gena u nepoznatom uzorku s očekivanim profilima za četiri intrinzična podtipa, kao što je opisano gore, radi izračunavanja četiri različite vrijednosti korelacije. Te vrijednosti korelacije zatim se kombiniraju s ocjenom proliferacije i veličinom vidljivog tumora radi izračunavanja ROR ocjene.

13.3 Vjerojatnost 10-godišnjeg udaljenog recidiva

ROR ocjena za 2 kohorte žena u postmenopauzi s rakom dojke u ranom stadiju pozitivnim na hormonski receptor uspoređene su s preživljenjem bez udaljenog recidiva nakon operacije i liječenja adjuvantnom hormonskom terapijom u trajanju od 5 godina te 5 godina praćenja (pojednosti pogledajte u odjeljku 16.4 Klinička izvedba). Ta dva ispitivanja rezultirala su modelom koji uspoređuje ROR ocjenu s vjerojatnošću udaljenog recidiva u toj testiranoj populaciji bolesnika, uključujući 95 %-tni interval pouzdanosti.

13.4 Klasifikacija rizika

Klasifikacija rizika također je dana kako bi se omogućilo tumačenje ROR ocjene upotrebom graničnih vrijednosti povezanih s kliničkim ishodom u testiranoj populaciji bolesnika.

Tablica 9: Klasifikacija rizika prema ROR rasponu i statusu čvora

Status čvora	ROR raspon	Klasifikacija rizika
Čvor je negativan	0 – 40	Nizak
	41 – 60	Srednji
	61 – 100	Visok
Čvor je pozitivan (1 do 3 čvora)	0 – 15	Nizak
	16 – 40	Srednji
	41 – 100	Visok
Čvor je pozitivan (≥ 4 čvora)	0 – 100	Visok

13.5 Kontrola kvalitete

Svaka partija komponenti testa Prosigna testira se upotrebom unaprijed određenih specifikacija. Sve stavke na razini kompleta praćene su prema partiji, a ključni dijelovi koji se nalaze unutar svakog kompleta zajedno su testirani i izdani kao partija kompleta Prosigna.

Komplet testa Prosigna uključuje seriju internih kontrola koje se upotrebljavaju za procjenu kvalitete svakog skupa ciklusa kao cjeline i svakog uzorka pojedinačno. Te su kontrole navedene u nastavku.

Kontrolni komplet serije: *In vitro* referentni uzorak transkribirane RNA

Sintetski referentni uzorak RNA uključen je kao kontrola unutar kompleta testa Prosigna. Referentni uzorak sastoji se od *in-vitro* transkribiranih RNA meta iz 50 algoritama i 8 osnovnih gena. Referentni uzorak obrađuje se u duplikatu u svakom ciklusu testa Prosigna zajedno sa skupom najviše 10 nepoznatih RNA uzoraka tumora dojke u epruveti u nizu s 12 jažica za reakciju. Signal iz referentnog uzorka analizira se i uspoređuje s unaprijed definiranim pragovima za kvalifikaciju ciklusa.

Signal iz svakog od 50 algoritamskih gena RNA uzorka tumora dojke normalizira se na odgovarajući gen iz referentnog uzorka.

Skup pozitivne kontrole: *In vitro* transkribirane RNA mete koje odgovaraju capute (vezanoj) probi i reporter probi

Sintetske RNA mete upotrebljavaju se kao pozitivne kontrole za test Prosigna. Sekvence mete pozitivne kontrole izvedene su iz biblioteke DNA sekvenci ERCC-a (External RNA Control Consortium)⁶. RNA mete su *in-vitro* transkribirane iz DNA plazmida. Šest RNA ciljeva uključeno je u komplet testa u četverostrukoj seriji titracije (128 – 0,125 fM konačna koncentracija u reakciji hibridizacije) zajedno s odgovarajućim vezanom probom i reporter probom. Pozitivne kontrole dodane su svakom RNA uzorku tumora dojke i referentnom uzorku koji se testiraju testom Prosigna. Uzorak će se diskvalificirati iz daljnje analize ako intenzitet signala iz pozitivnih kontrola ne udovoljavaju unaprijed definiranim pragovima.

Skup negativnih kontrola: egzogene probe bez meta

Sekvence mete negativne kontrole izvedene su iz biblioteke DNA sekvenci ERCC-a⁶. Probe osmišljene za otkrivanje tih sekvenci meta uključene su kao dio kompleta testa bez odgovarajuće sekvence mete. Negativne kontrole dodane su svakom RNA uzorku tumora dojke i referentnom uzorku koji se testiraju testom Prosigna kao mjere kontrole kvalitete. Uzorak će se diskvalificirati iz daljnje analize ako intenzitet signala iz negativnih kontrola ne udovoljavaju unaprijed definiranim pragovima.

Kontrolni set za cjelovitost RNA: osnovni geni

U komplet Prosigna uključene su vezane i reporter probe osmišljene za otkrivanje 8 osnovnih gena i 50 algoritamskih gena. Razine ekspresije 8 osnovnih gena analiziraju se radi određivanja kvalitete RNA ekstrahirane iz FFPE uzorka tkiva i unose se u test Prosigna. Uzorak će se diskvalificirati iz daljnje analize ako razine ekspresije osnovnih gena budu ispod unaprijed definiranih pragova.

Osnovni geni također se upotrebljavaju za normalizaciju razlika u količini intaktne RNA u uzorku prije normalizacije referentnog uzorka.

14 OGRANIČENJA POSTUPAKA

1. Test Prosigna optimiziran je za identifikaciju intrinzičnog podtipa tumora raka dojke i 10-godišnjeg rizika bolesnika od udaljenog recidiva u obliku ROR ocjene i kategorije rizika koristeći se pročišćenom RNA ekstrahiranom iz tkiva humane dojke fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin. Ostale vrste uzoraka ili fiksativa nisu ispitane i ne smiju se upotrebljavati.
2. Radne karakteristike testa Prosigna potvrđene su koristeći se samo postupcima navedenima u ovim uputama o proizvodu. Izmjene tih postupaka mogu izmijeniti radne karakteristike testa.
3. Radne karakteristike testa Prosigna utvrđene su za žene u postmenopauzi s rakom dojke u ranom stadiju pozitivnim na hormonski receptor liječene 5 godina adjuvantnom hormonskom terapijom. Radne karakteristike s ostalim režimima liječenja ili ostalim populacijama bolesnika nisu utvrđene.
4. Ako se testu doda RNA nedostadne kvalitete ili količine, test Prosigna možda neće dati valjani rezultat i umjesto toga prijaviti će pogrešku testa.
5. Tumačenje rezultata testa Prosigna (intrinzični podtip, ROR ocjena, kategorija rizika) treba procijeniti unutar konteksta ostalih kliničko-patoloških faktora, anamneze bolesnika i rezultata ostalih laboratorijskih testova.
6. Radne karakteristike testa Prosigna utvrđene su s RNA koja udovoljava specifikacijama definiranim u vezi s gore navedenim postupkom. Radne karakteristike izolirane RNA koja ne udovoljava tim specifikacijama nisu ustanovljene.
7. Poznate interferirajuće tvari s testom Prosigna uključuju genomsku DNA i netumorsko tkivo (npr. zdravo tkivo). Prije početka postupka uzmite u obzir općenita razmatranja o testu. Prije pokretanja postupka patolog treba jasno identificirati područje vijabilnog invazivnog karcinoma. Dodatno, svaki RNA uzorak treba tretirati DNazom. Prije nastavka s uzorcima bolesnika za testiranje, svaka nova partija DNaze treba se ispitati i kvalificirati prema danim specifikacijama kada se upotrebljava drugi komplet za izoliranje osim kompleta za ekstrakciju RNA Veracyte FFPE.

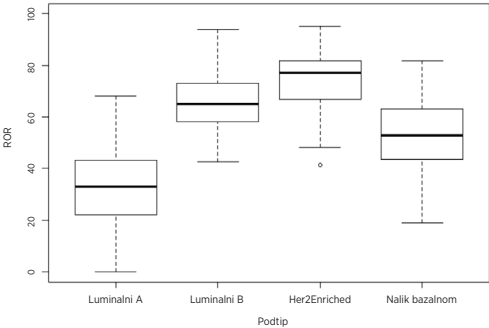
15 OČEKIVANE VRIJEDNOSTI

Test Prosigna prijavljuje ROR ocjenu (0 do 100), intrinzični podtip (luminalni A, luminalni B, HER2-enriched ili nalik bazalnom) te kategorizaciju rizika (nizak, srednji ili visok) za svaki uzorak tumora. Na temelju dva klinička ispitivanja za validaciju opisana u nastavku, žene u postmenopauzi s HR+, ranim stadijem raka dojke liječene anastrozolom ili tamoksifenom u pokusima ATAC i ABCSG-8, prikazani su očekivani raspon i učestalost ROR ocjena (Slika 10), neprekidan odnos ROR-a s vjerojatnošću udaljenog recidiva prema statusu čvora (Slika 11) i distribucija ROR ocjena prema intrinzičnom podtipu (Slika 9). Na temelju tih kliničkih ispitivanja za validaciju, preživljenje bez udaljenog recidiva dulje od 10 godina prema kategorizaciji rizika predstavljeno je na Slici 12 (bolesnici s negativnim čvorom) i Slici 13 (bolesnici s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)).

15.1 ROR raspon prema podtipu

Slika 9 prikazuje dijagram pravokutnika ROR ocjene prema intrinzičnom podtipu.

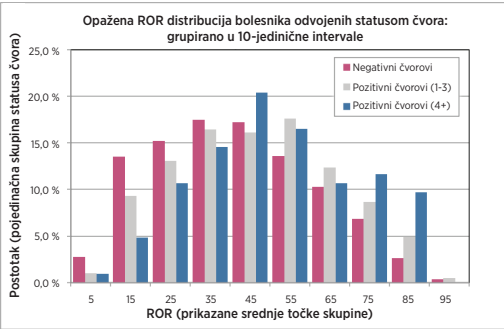
Slika 9: Dijagram pravokutnika ROR ocjene prema intrinzičnom podtipu



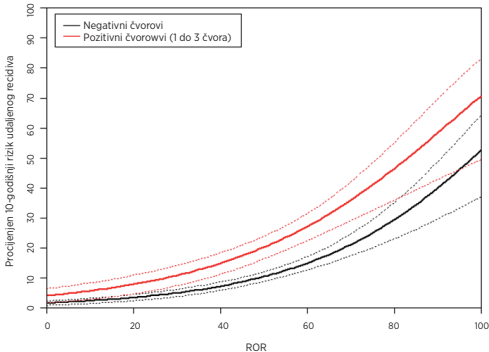
15.2 Učestalost ROR ocjene prema statusu čvora

Histogram na Slici 10 generiran je pomoću jednog Coxovog modela koji je uključivao ROR ocjenu i kategorijske varijable radi razlikovanja tri skupine uključenosti čvora.

Slika 10: Histogram ROR ocjene i skupine statusa čvora



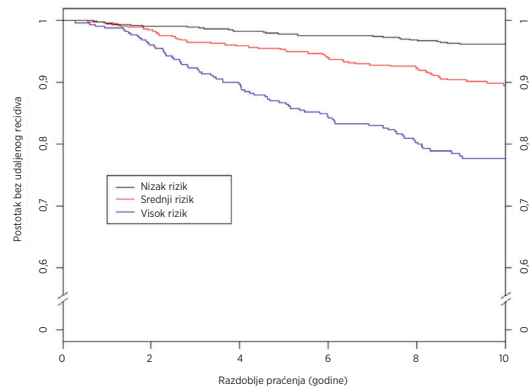
Slika 11: Desetogodišnji predviđeni rizik procijenjen unutar skupine statusa čvora



15.3 Preživljenje bez udaljenog recidiva prema kategorizaciji rizika

Sljedeći podaci proizlaze iz kombiniranih analiza pokusa TransATAC i ABCSG-8. Za dodjeljivanje bolesnika u skupine rizika, ROR ocjene uspoređene su s unaprijed definiranim pragovima rizika za bolesnike s negativnim čvorom ili pozitivnim čvorom. Slike 12 i 13 pokazuju desetogodišnje preživljenje bez udaljenog recidiva za svaku skupinu kategorije rizika prema statusu čvora.

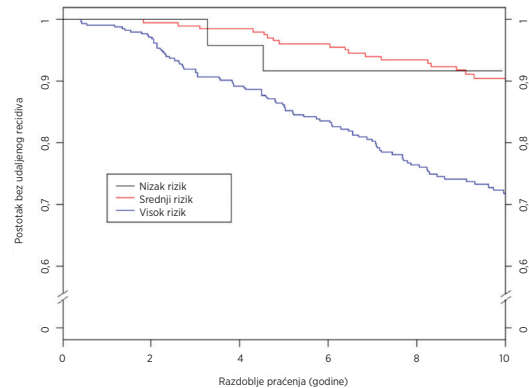
Slika 12: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom



Sažetak podatka za Sliku 12: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % – 97,3 %]
Srednji	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % – 91,7 %]
Visok	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % – 81,9 %]
Sveukupno	1.786 (100 %)	157	

Slika 13: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)



Sažetak podatka za Sliku 13: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % – 97,8 %]
Srednji	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % – 93,9 %]
Visok	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % – 76,6 %]
Sveukupno	590 (100 %)	107	

Tablica 10: Desetogodišnje DRFS stope za bolesnike s 4 ili više pozitivnih čvorova

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Visok	103	39	57,4 % [46,3 % – 67,0 %]

6 RADNE KARAKTERISTIKE

16.1 Analitička preciznost i reproducibilnost

Kako bi se procijenila sveukupna preciznost i reproducibilnost testa Prosigna, provedena su dva ispitivanja i rezultati su kombinirani. Prvo provedeno ispitivanje bilo je ispitivanje preciznosti na sustavu za analizu nCounter počevši s ekstrahiranim RNA tumora dojke, a drugo ispitivanje bilo je ispitivanje reproducibilnosti počevši od tkiva tumora dojke fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin koje je uključivalo predanalitičke faktore.

Preciznost RNA

16.1.1 Plan ispitivanja

Slijepo i randomizirano usporedno ispitivanje na tri lokacije provedeno je s testom Prosigna na sustavu za analizu nCounter radi procjene analitičke preciznosti. Iz arhiviranih FFPE uzoraka generirano je pet puliranih uzoraka RNA tumora dojke radi ispitivanja na svakoj lokaciji. Panel uzorka predstavljao je prototipične profile ekspresije gena pronađene tijekom rutinskog testiranja i svaku skupnu klasifikacije rizika.

Svaka lokacija učinila je 18 valjanih ciklusa (9 ciklusa po svakom rukovatelju, svaki ciklus sastojao se od 10 testova) nakon ciklusa upoznavanja svakog rukovatelja (Tablica 11). Svaki je uzorak dvostruko testiran tijekom svakog ciklusa pri nominalnoj razini RNA unosa od 250 ng za test. Svaki rukovatelj izvršio je jedan ciklus na određeni dan prema općenito prihvaćenim standardima za dugoročne metode⁷. Ukupno razdoblje ispitivanja uključujući upoznavanje pokrivalo je više od 4 tjedna na svakoj lokaciji.

Tablica 11: Pregled ispitivanja preciznosti RNA

Variable ispitivanja	Brojevi
broj uzoraka RNA tumora dojke	5
broj replikata uzoraka po ciklusu (ista kaset)	2
broj ciklusa/lokacija	18
broj ciklusa/dan	1
broj rukovatelja/lokacija	2
broj partija reagensa/lokacija	3
broj lokacija	3
<i>Ukupan broj testiranih uzoraka po lokaciji (osim upoznavanja)=</i>	<i>180</i>
<i>Ukupan broj uzoraka =</i>	<i>540</i>

16.1.2 Analiza sastavnih dijelova varijance

Tablica 12 prikazuje rezultate analize sastavnih dijelova varijance za svakog člana panela. Ispod procijenjene varijance nalazi se postotak ukupne varijance (u zagradama).

Tablica 12: Sastavni dijelovi varijance prema članu panela (puliran uzorak RNA)

Član panela prema riziku, podtip	Srednja vrijednost ROR	Sastavni dio varijance					Ukupna varijanca	Ukupno standardno odstupanje
		Lote	Centro	Operator	Ciclo	Intracelo		
Nizak Liminalni A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66
Srednji Liminalni B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76
Srednji nalik bazalnom	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55
Visok Liminalni B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76
Visok HER2-enriched	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66

Za svih pet članova panela, ukupno standardno odstupanje bilo je manje od 1 ROR jedinice na ljestvici od 0 do 100. Za sve članove panela, većina varijance dolazi iz varijance unutar ciklusa (ponovljivost). Nije gotovo uopće bilo varijance od lokacije do lokacije ili od rukovatelja do rukovatelja. Test omjera vjerojatnosti za značaj lokacije prema članu panela pokazao je da su razlike prema lokaciji bile statistički neznajčajne ($p > 0,05$). Za svaku partiju, srednja vrijednost ROR ocjena manja je od 1 ROR jedinice osim za svakog člana panela koji ukupnoj varijanci doprinosi prosječno približno 20 %.

16.1.3 Sukladnost klasifikacije rizika i udio podtipa

Za sve članove panela postojala je 100 %-tna sukladnost između rezultata podtipa i intrinzičnog podtipa člana panela. Za sve uzorke, postojala je 100 %-tna sukladnost između izmjerene i očekivane skupine rizika.

Reproducibilnost tkiva

16.1.4 Plan ispitivanja

Slijepo i randomizirano usporedno ispitivanje na tri lokacije u kojem su se ispitivali replikati uzoraka tkiva tumora dojke uzeti iz istog FFPE bloka na sustavu za analizu nCounter uz pomoć testa Prosigna. Skup 43 nedavno pohranjenih FFPE uzoraka tumora dojke bolesnika s rakom dojke pozitivnim na hormonski receptor s potvrđenim invazivnim duktalnim i/ili lobularnim karcinomom testirano je kao dio ispitivanja. Svi uzorci tkiva otpremljeni su na odgovarajuće lokacije za testiranje radi obrade. 43 uzorka pregledala su neovisno tri različita patologa. Za svaki uzorak tkiva koji je pregledao patolog izvršen je probni ciklus koji se sastojao od makrodisekcije tkiva, ekstrakcije RNA i testiranja testom Prosigna, a što je proveo jedan rukovatelj na svakoj lokaciji koristeći se definiranim postupkom testiranja. Izolirana RNA iz svakog uzorka tkiva dvaput je testirana u zasebnim ciklusima testiranja. Za izvođenje ovog ispitivanja upotrijebljene su tri partije kompleta za izoliranje RNA (jedan po lokaciji) i jedna partija reagensa iz kompleta za test. Umetnuto je jedno stakalce za ekstrakciju RNA kada je izmjerena površina tumora $\geq 100 \text{ mm}^2$, a 3 stakalca umetnuta su kada je izmjerena površina tumora $< 100 \text{ mm}^2$, s minimalnom potrebno površinom tumora od 4 mm^2 .

16.1.5 Sažetak testiranja

Stopa udjela za četrdeset i tri (43) uzorka tkiva procijenjena na svakoj od tri lokacija prikazana je u Tablici 13.

Tablica 13: Stopa udjela na svakoj lokaciji

Lokacija	Rezultat u postotku	Uspješno/Ukupno
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Četrdeset uzoraka dalo je rezultate na svim lokacijama (izoliranje RNA jednog uzorka na jednoj lokaciji trebalo je ponoviti), 1 uzorak dao je rezultate na 2 lokacije i 2 uzorka dala su rezultate na jednoj lokaciji. Sto posto (100 %) uzoraka koji su uspješno prošli pregled tkiva i specifikacije izoliranja RNA dalo je prolazne rezultate za test Prosigna. Izmjerena površina tumora za 4/5 neuspjelih izoliranja RNA bila je $\leq 15 \text{ mm}^2$, što čini manje od 50 mm^2 ukupnog unosa tkiva prema području u test.

43 uzorka uključivala su bolesnike s pozitivnim i negativnim čvorovima. Izračunati rezultati testa iz 43 uzorka predstavljaju širok raspon (94 jedinice) ROR ocjena, sva 4 intrinzična podtipa i sve kategorije rizika kada se na sve uzorke primijene granične vrijednosti za negativan čvor ili pozitivan čvor. Dva uzorka s rezultatima na jednoj lokaciji isključena su iz svih daljnjih statističkih analiza jer nije bilo dostupnih podatka za usporedbu preko lokacija.

16.1.6 Analiza sastavnih dijelova varijance

Nije bilo statistički značajnih razlika ($\alpha = 0,05$) između kategorija rizika pri upotrebi neparametrijskog testa Kruskal-Wallis tako da je model sastavnih dijelova varijance istovremeno primijenjen na sve kategorije rizika.

Tablica 14 prikazuje rezultate analize sastavnih dijelova varijance uz upotrebu svih 41 uzoraka tkiva.

Tablica 14: Sastavni dijelovi varijance (ispitivanje reproducibilnosti tkiva)

Sastavni dijelovi varijance				Ukupno standardno odstupanje
Lokacija	Unutar bloka	Preostali	Sveukupno	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Sastavni dio lokacije mjeri sistemsku varijaciju specifičnu za lokaciju, sastavni dio „unutar bloka“ mjeri nasumičnu varijaciju koja se razlikuje kao funkcija pregleda/obrade uzorka tkiva ili unutar varijacije FFPE bloka, a preostala varijacija mjeri kombinirani ciklus s varijabilnošću ciklusa i varijabilnost unutar ciklusa u testu Prosigna. Sastavni dio lokacije vrlo je malen u odnosu na nasumičnu varijabilnost unutar bloka što ukazuje na to da su razlike između lokacija u prosjeku bile zanemarive ($< 1 \%$ ukupne varijance). Preostala varijacija bila je dosljedna s ekvivalentnom varijabilnošću izmjenom u ispitivanju preciznosti RNA koja je imala manje uzoraka, ali više mjerenja replikata (varijanca od 0,51 u usporedbi s prosječnom pojedinačnom lokacijom unutar varijance od 0,39 za partiju reagensa Prosigna u ispitivanju preciznosti RNA).

U Tablici 15 prikazan je sažetak ukupne varijabilnosti uz upotrebu ukupne vrijednosti varijabilnosti obrade tkiva (sastavni dijelovi za lokaciju i unutar bloka iz Tablice 14 iz tog ispitivanja) kao i ukupna varijabilnost obrade RNA iz ispitivanja preciznosti RNA (prosječno kroz pet ispitanih članova panela u Tablici 12). Predanalitički faktori povezani s obradom tkiva primarni su izvor varijacije za test (94 % ukupne varijance). Ukupno standardno odstupanje uključujući sve izvore varijacije jednako je 2,9 što ukazuje na to da je test Prosigna pouzdano mjerilo razlike između dviju ROR vrijednosti od 6,75 s 95 %-tnom pouzdanošću.

Tablica 15: Ukupna varijabilnost (obrada tkiva i RNA)

Varijabilnost obrade tkiva	Varijabilnost obrade RNA	Ukupna varijabilnost	Ukupno standardno odstupanje
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Sukladnost klasifikacija kategorije rizika i podtipa

Sukladnost od lokacije do lokacije prema klasifikaciji podtipa i rizika za bolesnika (nizak/srednji/visok rizik) prikazana je u Tablici 16 gdje su na sve uzorke primijenjene pripadajuće granične vrijednosti rizika za klasifikaciju negativnog čvora i pozitivnog čvora. Konkretni 95 %-tni intervali pouzdanosti prikazani su u uglatim zagradama, a broj uzoraka s rezultatima na obje lokacije prikazan je u običnim zagradama. Prosječna sukladnost prikazana je u zadnjem stupcu. Za svaku usporedbu izračunata je sukladnost u dva koraka. Prvo, za svaki uzorak tkiva, izračunat je udio četiri moguća para rezultata (dva na lokaciji 1 * dva na lokaciji 2) koja su se podudarala. U drugom koraku, ti su udjeli uprosječeni kroz sve uzorke tkiva koji su generirali rezultate na obje lokacije u danoj usporedbi.

Tablica 16: Sažetak sukladnosti podtipa i kategorije rizika prema statusu čvora

Vrsta usporedbe	Usporedba parova			Prosječna sukladnost
	Lokacija 1 u odnosu na lokaciju 2 (n = 40)	Lokacija 1 u odnosu na lokaciju 3 (n = 41)	Lokacija 2 u odnosu na lokaciju 3 (n = 40)	
Podtip	96,3 % [86,4 % - 99,5 %]	98,8 % [91,0 % - 100 %]	95 % [83,1 % - 99,3 %]	97 %
Kategorija rizika Čvor je negativan	87,5 % [73,2 % - 95,8 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	90 % [76,4 % - 97,2 %]	90 %
Kategorija rizika Pozitivan čvor	88,8 % [75,9 % - 96,0 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	91,3 % [79,2 % - 97,4 %]	91 %

Za svaku usporedbu (podtip i kategorije rizika s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom), prosječna sukladnost između lokacija bila je najmanje 90 %. Nije bilo uzoraka gdje je kategorija rizika promijenjena s niskog rizika na visok rizik (ili obrnuto) između ili unutar lokacija. Samo dva uzorka (od 41) nisu dala identične podtipove kroz svih 6 replikata:

1. Jedan uzorak imao je duplicirane rezultate za luminalni A na jednoj lokaciji i duplicirane rezultate za luminalni B na obje druge lokacije.
2. Jedan uzorak imao je duplicirani rezultat za luminalni A na jednoj lokaciji, duplicirani rezultat za HER2-enriched na drugoj lokaciji i po jedan luminalni A i HER2-enriched na trećoj lokaciji.

16.2 Osjetljivost/RNA unos

Opis ispitivanja za RNA unos

Ispitivanje je testiralo 13 RNA uzoraka tumora dojke kroz tri razine RNA unosa unutar specifikacija testa (500, 250 i 125 ng) i dvije dodatne razine RNA unosa izvan specifikacija (625, 62,5 ng). Svaki je uzorak ispitivan sa svakom partijom kompleta (ukupno 2 partije) u jednom ciklusu testiranja koji je uključivao dvostruka mjerenja na svakoj razini u specifikaciji i jedno mjerenje za svaku razinu izvan specifikacije. Dvostruka slijeпа (tj. bez mete) mjerenja bila su uključena u svaki ciklus testiranja. Jedan uzorak testiran je samo s jednom partijom.

Rezultati ispitivanja za RNA unos

Svi izmjerени slijeپی uzorci (n = 46) bili su dosta ispod praga za signal i dali su neuspješan rezultat testiranja (stopa udjela od 0 %). Sva mjerenja RNA tumora unutar specifikacija testa (n = 138) dala su prolazni rezultat testiranja (stopa udjela 100 %). Sto posto (100 %) uzoraka s unosom iznad specifikacije (625 ng) dalo je prolazni rezultat testiranja. Osamdeset i tri posto (83 %) uzoraka (10/12) testiranih s unosom ispod specifikacije (62,5 ng) dalo je rezultat testiranja u partiji 1 sa 100 % u partiji 2.

Prosječna ROR ocjena za 13 uzoraka pokrivena širokim rasponom (20 – 82). Klasifikacija skupine rizika (nizak/srednji/visok) bila je 100 % sukladna kroz sve razine RNA unosa za 13 testiranih uzoraka. U Tablici 17 sažeta je varijacija ROR

ocjene kao funkcija RNA unosa. Srednja razlika ROR ocjene između razina RNA unosa, SD za razlike i 90 %-tni interval pouzdanosti korišteni su za procjenu jesu li ROR ocjene generirane iz različitih razina RNA unosa ekvivalentne onima generiranim pomoću ciljне razine od 250 ng. Kako bi udovoljavao kriteriju prihvatljivosti, interval pouzdanosti trebao je biti potpuno zadržan (-3,3 ROR). Na dvije razine na ekstremima raspona specifikacije testa (125 i 500 ng RNA), ROR ocjene bile su ekvivalentne onima na koncentracijama ciljнog unosa od 250 ng za svaku od dvije testirane partije kompleta. Za svaku razinu izvan specifikacije testa ROR ocjene bile su ekvivalentne jednoj od partija, ali ne i drugoj.

Tablica 17: Sažetak razlika ROR ocjene. Zbroj je jednak broju uzoraka uključenih u analizu.

Partija kompleta	Masa (ng)	Zbroj	Razlika srednje vrijednosti ROR	SD razlike	Donja granica pouzdanosti	Gornja granica pouzdanosti
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

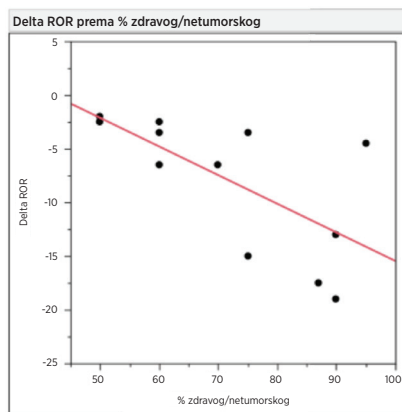
16.3 Testiranje interferencija

Susjedno zdravo/netumorsko tkivo

Susjedno zdravo /netumorsko tkivo dojke obično je prisutno u FFPE blokovima tumora dojke i može se identificirati nakon pregleda patologa kao područje koje se razlikuje od područja invazivnog karcinoma dojke. Postupak testa Prosigna gore specifičira uklanjanje susjednog zdravog tkiva makrodisekcijom. Kako bi se procijenio rizik kontaminacije rezultata testiranja zdravim tkivom, testirano je, sa i bez makrodisekcije okolnog tkiva, ukupno 13 FFPE blokova tumora dojke koji sadrže patološki potvrđeni infiltrirajući duktalni karcinom i približno 50 do 95 % okolnog zdravog/netumorskog tkiva te je utvrđena razlika u ROR ocjeni (delta ROR).

Prosječno je ROR makrodiseciranog uzorka tumora bio gotovo 8 ROR jedinica iznad onoga što je opaženo kada zdravo/netumorsko tkivo nije bilo uklonjeno. Na Slici 14 prikazano je da kako se količina zdravog tkiva povećava (do 95 % neuklonjenog tkiva makrodisekcijom), tako se povećava rizik da će prijavljena ROR ocjena biti podcijenjena ili negativno pristrana (do -19 ROR jedinica) procjena bolesnikovog rizika za ponavljanje bolesti.

Slika 14: Utjecaj zdravog/netumorskog tkiva na delta ROR



Interferencije od nekrotičnog, hemoragijskog i DCIS tkiva

Kako bi se procijenio rizik kontaminacije rezultata testiranja nekrotičnim/hemoragijskim/DCIS tkivom, ukupno 11 FFPE blokova tumora dojke (3 DCIS, 5 nekrotičnih i 3 hemoragijska) koji sadrže patološki potvrđeni invazivni karcinom dojke i približno 10 do 30 % interferentnih tkiva testirano je sa i bez makrodisekcije interferentnog tkiva te je utvrđena razlika u ROR ocjeni (delta ROR). Na testiranim razinama, učinak krvarećeg/hemoragijskog, DCIS i nekrotičnog tkiva uključenih u postupak imao je zanemariv utjecaj na prijavljenu ROR ocjenu (< 6 ROR jedinica). Postojala je 100 %-tna sukladnost u dodjeljivanju kategorije rizika između jedanaest nekrotičnih, hemoragijskih i DCIS uzoraka sa i bez makrodisekcije.

Humani genomski DNA

Postupak testa Prosigna uključuje uklanjanje humanog genomskog DNA (gDNA) razgradnjom s DNazom I. Kako bi se procijenio rizik kontaminacije rezultata testiranja s gDNA, deset (10) FFPE blokova tumora dojke koji sadrže patološki potvrđen infiltrirajući duktalni karcinom bilo je testirano sa i bez uklanjanja humane genomске DNA, izostavljanjem koraka DNaze unutar postupka. U testiranim uzorcima, prosječno je ROR ocjena bila 4 do 5 jedinica niža u skupinama niskog i srednjeg rizika kada je gDNA uklonjena DNazom (pogledajte Tablicu 18). Kada su uzorci koji nisu bili tretirani DNazom naknadno bili tretirani DNazom I (naknadno tretiranje), ROR ocjene odgovarale su ROR vrijednostima izvorno opaženima s tretmanom DNazom tijekom protokola. Postoji rizik da će prijavljena ROR ocjena biti precijenjena ili pozitivno pristrana (do 7 ROR jedinica) procjena bolesnikov rizika za ponavljanje bolesti u prisutnosti gDNA. Nadalje, izračunati signal za uzorke bez tretmana DNazom I bio je značajno ($p < 0,05$) niži od onih tretiranih DNazom I zbog interferencije u očitavanju apsorpcije koja se koristila za kvantifikaciju količine RNA prije testiranja testom Prosigna.

Tablica 18: Utjecaj tretmana s Dnazom na ROR u uzorcima tumora

ROR Kategorija	Testirani FFPE uzorci	ROR razlika s DNazom I – bez DNaze I			ROR razlika s DNazom I – bez DNaze I (nakon tretmana)		
		Sredina	Min.	Maks.	Sredina	Min.	Maks.
Nizak	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Srednji	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Visok	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinička izvedba

Provedene su dva klinička validacijska ispitivanja radi validacije prognostičkog genskog testa za rak dojke Prosigna. Primarna svrha obiju ispitivanja bila je validirati objavljena opažanja da ocjena rizika od ponavljanja bolesti (ROR) daje dodatne prognostičke podatke za preživljenje bez udaljenog recidiva nakon 10 godina iznad standardnih kliničkih varijabli. Također, druga svrha obaju ispitivanja usmjerena je na validaciju prethodnih opažanja da bolesnici s podtipom luminalni A i luminalni B imaju statistički značajno različito preživljenje bez udaljenog recidiva nakon 10 godina. Budući da su kriteriji uključivanja i rezultati tih dvaju ispitivanja bili slični, dvije baze podataka kombinirane su i analizirane s prospektivno definiranim planom analize koji je imao iste ciljeve kao pojedinačna ispitivanja

Kombinirana analiza: Stvaranja krivulja rizika pomoću kombiniranih rezultata testa Prosigna iz pokusa TransATAC i ABCSG-8

Sažetak tretmana i kliničkih svojstava iz kombinirane analize nalazi se u nastavku. Za pojedinačne planove ispitivanja i podatke o analizi pogledajte sljedeće odjeljke za ispitivanja 1 i 2.

Analiza

Tablica 19: Sažetak tretmana i kliničkih svojstava u kombiniranoj analizi ispitivanja 1 i 2

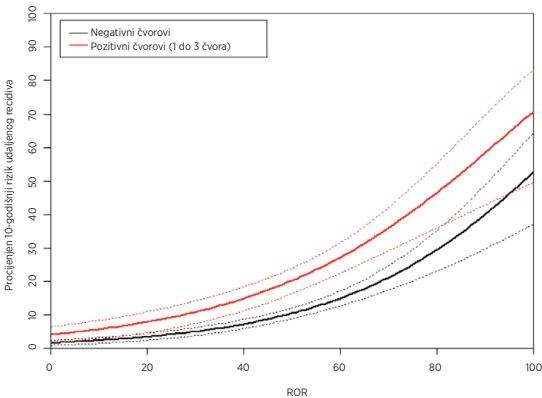
Svojstva	Vrijednost	Čvor je negativan (n = 1786)		1 – 3 pozitivna čvora (n = 590)		≥ 4 pozitivna čvora (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Obrada	Nešto anastrozola	377 (51,0 %)	528 (50,4 %)	102 (49,0 %)	184 (48,2 %)	31 (57,4 %)	25 (51,0 %)
	Samo tamoksifen	362 (49,0 %)	519 (49,6 %)	106 (51,0 %)	198 (51,8 %)	23 (42,6 %)	24 (49,0 %)
Gradus	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 (58,7 %)	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 %)
Veličina tumora	≤ 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 %)
Status HER2	Negativan	649 (87,8 %)	984 (94,0 %)	186 (89,4 %)	367 (96,1 %)	47 (87,0 %)	46 (93,9 %)
	Pozitivan	90 (12,2 %)	63 (6,0 %)	22 (10,6 %)	15 (3,9 %)	7 (13,0 %)	3 (6,1 %)
Recidiv	Udaljen	79 (10,7 %)	91 (8,7 %)	50 (24,0 %)	64 (16,8 %)	31 (57,4 %)	10 (20,4 %)
	Bilo koji	117 (15,8 %)	121 (11,6 %)	59 (28,4 %)	73 (19,1 %)	34 (63,0 %)	10 (20,4 %)
Intrinzični podtip NanoString	Luminalni A	529 (71,6 %)	725 (69,2 %)	127 (61,1 %)	248 (64,9 %)	31 (57,4 %)	31 (63,3 %)
	Luminalni B	176 (23,8 %)	284 (27,1 %)	68 (32,7 %)	118 (30,9 %)	20 (37 %)	16 (32,7 %)
	Nalik bazalnom	7 (0,9 %)	6 (0,6 %)	2 (1,0 %)	2 (0,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	HER2-enriched	27 (3,7 %)	32 (3,1 %)	11 (5,3 %)	14 (3,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)

Oba ispitivanja imala su terapijsku skupinu koja se sastojala o 5-godišnje terapije tamoksifenom. U pokusu TransATAC, druga skupina ispitivanja sastojala se od 5-godišnje terapija anastrozolum, dok se u pokusu ABCSG-8 druga skupina sastojala od 2-godišnje terapija tamoksifenom nakon koje je slijedila 3-godišnja terapija anastrozolum. Kada je DR modeliran kao funkcija svih kliničkih i terapijskih varijabli, terapija nije značajno doprinosila ($p = 0,66$) kao DR prediktor. Ostale glavne razlike između tih pokusa bile su u činjenici da je pokus TransATAC uključivao bolesnike s tumorom gradusa 3, a da je sveukupna stopa povrata bolesti bila viša u ispitivanju TransATAC u odnosu na ABCSG-8.

Rezultati

Na slici 15 prikazan je 10-godišnji rizik od udaljenog recidiva kao funkcija ROR ocjene s pojasevima 95 %-tne pouzdanosti na temelju zasebnih Coxovih modela proporcionalne opasnosti za svaku od skupina bolesnika s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 pozitivna čvora).

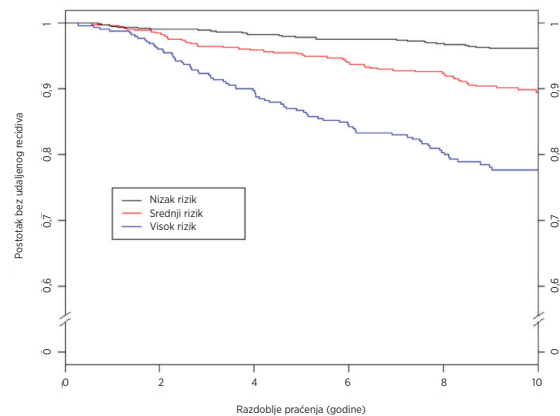
Slika 15: Desetogodišnja procijenjena opasnost od udaljenog recidiva prema statusu čvora s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti



Na Slici 16 prikazan je Kaplan-Meierov dijagram i dijagram incidencije prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom, a na Slici 17 prikazani su isti dijagrami za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 do 3 pozitivna čvora. Na svakoj slici

navedena je veličina uzorka, broj događaja i procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina s navedenom skupinom rizika. U skupini bolesnika s pozitivnim čvorom, vrlo je malo bolesnika u unaprijed definiranim skupinama niskog rizika što izaziva vrlo širok interval pouzdanosti na Kaplan-Meierovoj krivulji, a time i široku procjenu 10-godišnjeg preživljenja bez udaljenog recidiva.

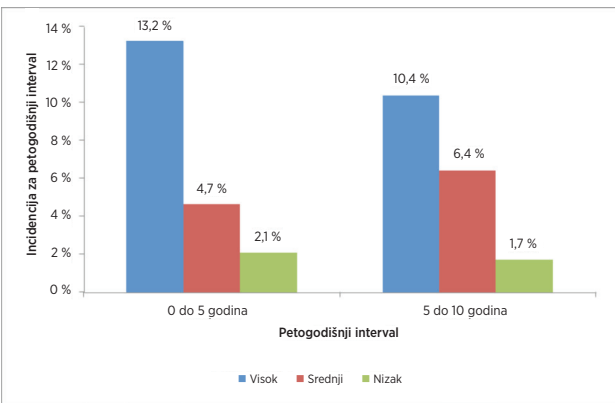
Slika 16A: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom



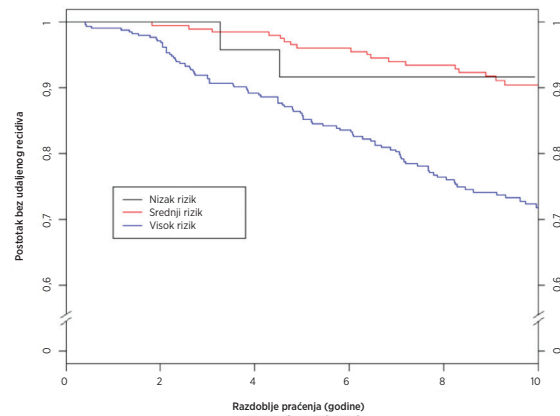
Sažetak podatka za Sliku 16A: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % – 97,3 %]
Srednji	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % – 91,7 %]
Visok	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % – 81,9 %]
Sveukupno	1.786 (100 %)	157	

Slika 16B: Incidencija prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom u petogodišnjim intervalima



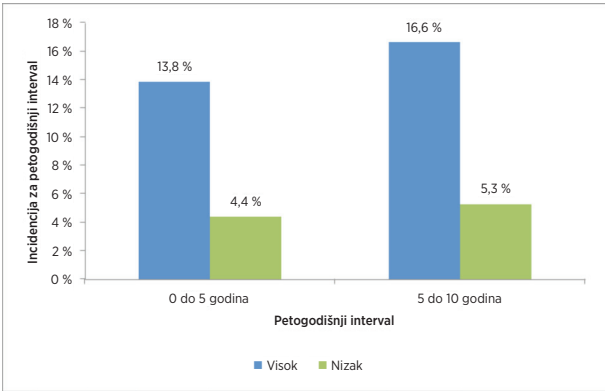
Slika 17A: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 do 3 pozitivna čvora



Sažetak podatka za Sliku 17A: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 do 3 pozitivna čvora

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % – 97,8 %]
Srednji	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % – 93,9 %]
Visok	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % – 76,6 %]
Sveukupno	590 (100 %)	107	

Slika 17B: Incidencija prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) u petogodišnjim intervalima



Budući da su bila samo 24 bolesnika s 2 događaja u skupini s pozitivnim čvorom i niskim rizikom, na slici 17B ti su bolesnici kombinirani s bolesnicima sa srednjim rizikom za analizu kasnog ponavljanja bolesti.

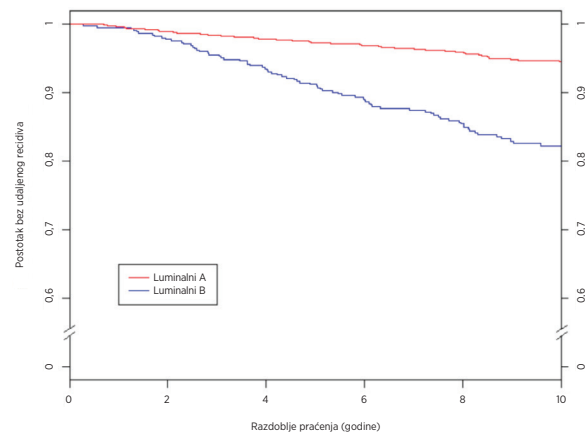
Sva 103 bolesnika u kombiniranoj bazi podataka s 4 ili više pozitivnih čvorova klasificirani su kao visokog rizika. U Tablici 20 prikazane su stope desetogodišnjeg DRFS-a za te bolesnike.

Tablica 20: Desetogodišnje DRFS stope za bolesnike s 4 ili više pozitivnih čvorova

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Visok	103	39	57,4 % [46,3 % – 67,0 %]

Većina ispitanika u kombiniranim ispitivanjima (96 %) bila je ili luminalni A ili luminalni B podtip. Na Slici 18 prikazana je usporedba DRFS-a prema luminalnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom.

Slika 18: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom

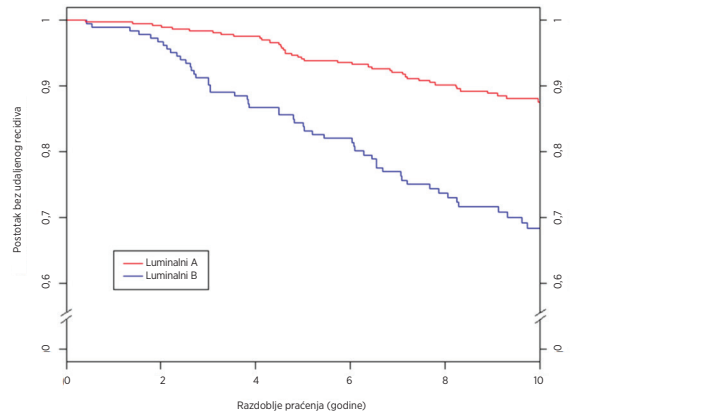


Sažetak podatka za Sliku 18: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Luminalni A	1254	62	94,6 [93,1 – 95,8]
Luminalni B	460	75	81,9 [77,7 – 85,3]
Sveukupno	1.714	137	

Na Slici 19 prikazana je ista usporedba za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 do 3 pozitivna čvora. Za obje je skupina postojala značajna razlika između DRFS-a bolesnika s luminalnim A i luminalnim B podtipom.

Slika 19: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora



Sažetak podatka za Sliku 19: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Luminalni A	375	41	87,6 [83,5 – 90,8]
Luminalni B	186	52	68,3 [60,4 – 75,0]
Sveukupno	561	93	

U kombiniranoj bazi podataka bilo je samo 98 bolesnika s luminalnim podtipom s 4 ili više pozitivnih čvorova. U Tablici 21 prikazane su stope desetogodišnjeg DRFS-a za te bolesnike koje pokazuju mnogo viši rizik kod bolesnika s luminalnim B podtipom.

Tablica 21: Desetogodišnje DRFS stope za bolesnike s 4 ili više pozitivnih čvorova prema Luminalnom podtipu

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Luminalni A	62	17	68,3 [53,6 – 79,3]
Luminalni B	36	20	38,0 [21,4 – 54,5]
Sveukupno	98	37	

Analiza kasnog ponavljanja bolesti

U prethodno opisanim podacima kombinirane analize, stope događaja unutar svake skupine rizika nisu stalne kroz 10-godišnji interval što se može vidjeti na Slikama 16B i 17B. Kako bi se dodatno razumjeli udaljeni recidivi u razdoblju kasnog ponavljanja bolesti, post-hoc retrospektivna analiza kombiniranih podataka opisana iznad provedena je za podskup bolesnika koji su bili bez udaljenog recidiva kroz pet godina (ukupno 2163 bolesnika8). Od njih, 1605 bolesnika imalo je negativan čvor, a 488 bolesnika imalo je pozitivan čvor (1 – 3 pozitivna čvora). Za svaku skupinu čvora vrijednosti ispod x-osi nakon 5 godina na slikama 20 i 21 pokazuju broj rizičnih bolesnika prema skupini rizika nakon pet godina, tj. pogodnih za analizu kasnog ponavljanja bolesti.

U Tablici 22 naveden je sažetak terapije i kliničkih svojstava za bolesnike s negativnim čvorom i pozitivnom čvorom (1 do 3 čvora) u analizi kasnog ponavljanja bolesti.

Tablica 22: Sažetak terapije i kliničkih svojstava za analizu kasnog ponavljanja bolesti

Svojstva	Vrijednost	Negativan čvor (n = 1605)		Pozitivan čvor (1 – 3 čvora) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Obrada	Nešto anastrozola	480	346	153	89
	Samo tamoksifen	464	315	158	88
Gradus	Jažica	192	158	46	36
	Umjereno	752	394	265	105
	Slabo	0	109	0	36
Veličina tumora	≤ 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
Status HER2	Negativan	888	590	300	157
	Pozitivan	56	71	11	20
Recidiv	Udaljen	41	40	28	29
	Bilo koji	71	78	37	37
Intrinzični podtip NanoString	Luminalni A	674	488	218	112
	Luminalni B	245	150	87	54
	Nalik bazalnom	4	5	0	1
	HER2-enriched	21	18	6	10

Primarni cilj bila je procjena mogućnosti da ROR ocjena pruži značajne dodatne prognostičke podatke za DRFS iznad standardnih kliničkih varijabli nakon 5 i 10 godina. Nulti model koji se sastoji samo od CTS-a uspoređen je s alternativnim modelom koji se sastoji od CTS-a i ROR-a koristeći se testom omjera vjerojatnosti (LR). ROR je dodao statistički značajne podatke za 5-godišnji DRFS iznad standardnih kliničkih varijabli za sve bolesnike (p < 0,0001) kao i za bolesnike s negativnim čvorom (p < 0,0001) i bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) (p < 0,0001).

U Tablici 23 prikazan je sažetak omjera opasnosti za promjenu u 10 točaka na jednovarijantnoj analizi i na multivarijacijskoj analizi koje su uključivale i ROR ocjenu i CTS. Omjeri opasnosti za ROR ocjenu svi su značajno različiti od 1 čak i nakon prilagođavanja za CTS. U Tablici 22 prikazani su i C-indeksi. Za obje skupine C-indeksi se značajno razlikovao od vrijednosti bez podataka od 0,5.

Tablica 23: Sažetak ispitivanja kasnog ponavljanja bolesti

Broj pozitivnih čvorova	N	Omjer opasnosti: Promjena ROR ocjene u 10 točaka		C-indeksi s 95 %-tnim intervalima pouzdanosti		
		Jednovarijantna analiza	Multivarijacijska analiza	C-indeks	Niži	Viši
0	1.605	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 %

Većina bolesnika u ta dva ispitivanja bila je HER2-negativna. U Tablici 24 prikazana je distribucija statusa HER2 za žene s negativnim čvorom i pozitivnom čvorom (1 do 3 čvora). U obje skupine više od 90 % žene u ispitivanjima bilo je HER2-negativno.

Tablica 24: Distribucija statusa HER2 prema broju pozitivnih čvorova

Podskup bolesnika	Status HER2		Sveukupno
	Negativan	Pozitivan	
Bolesnici s negativnim čvorom	1478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1.605
Bolesnici s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

U Tablici 25 prikazana je usporedba multivarijacijskog modela prilagođenog svim bolesnicima u danoj skupini čvora i modela prilagođenog svim bolesnicima sa statusom HER2-negativan u skupini. Nema statistički značajnih razlika.

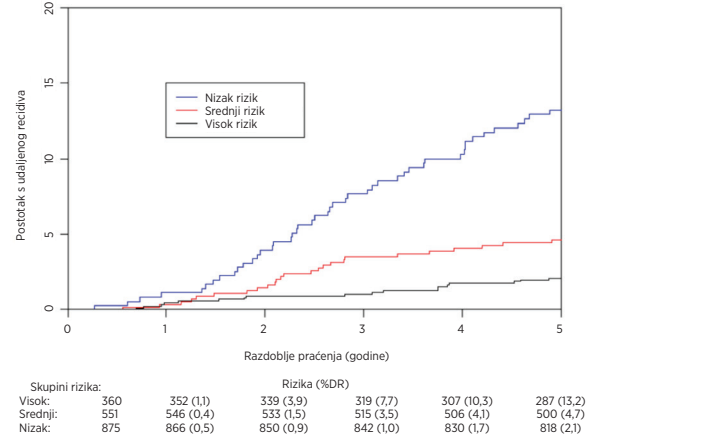
Tablica 25: Multivarijacijski omjeri opasnosti za promjenu ROR ocjene u 10 točaka: Svi bolesnici unutar podskupine u odnosu na HER2-negativne bolesnike unutar podskupine

Broj pozitivnih čvorova	Svi bolesnici [95 %-tni CI]	HER2-negativni bolesnici [95 %-tni CI]
Bolesnici s negativnim čvorom	1,29 [1,15 – 1,46]	1,35 [1,19 – 1,54]
Bolesnici s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora	1,34 [1,16 – 1,53]	1,29 [1,11 – 1,50]

Usporedba kroz skupine rizika dodatno je istražena u Slikama 20 i 21 koje pokazuju krivulje incidencije za rano i kasno udaljeno ponavljanje bolesti izvedeno prema skupini rizika u bolesnika s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora). Krivulja incidencije pokriva razdoblje ranog ponavljanja bolesti (u prvih 5 godina) i razdoblje kasnog ponavljanja bolesti (između 5 i 10 godina nakon dijagnoze). Neposredno ispod x-osi svake slike prikazani su brojevi žena pod rizikom i kumulativna incidencija. Tablice sažetka ispod Slika prikazuju interval pouzdanosti za kumulativnu DR stopu nakon 5 godina ili 10 godina za one žene koje nisu imale udaljenog recidiva nakon dovršetka 5-godišnje terapije. Na bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) predstavljene na Slici 21, skupine niskog i srednjeg rizika kombinirane su s obzirom na mali broj bolesnika u skupini niskog rizika.

Populacija niskog rizika ima nisku vjerojatnost ponavljanja bolesti između 5. i 10. godine nakon 5 godina hormonske terapije kako je pokazano kumulativnom krivuljom incidencije i pripadajućim omjerima opasnosti za svaku skupinu rizika. Međutim, populacije srednjeg i visokog rizika imaju stalan rizik od kasnog udaljenog recidiva nakon 5 godina od završetka hormonske terapije. Razlika u ishodu između populacija srednjeg i visokog rizika s negativnim čvorom ustanovljena je u prvih 5 godina (DR stopa = 13,2 % [9,6 % – 16,7 %] za bolesnike visokog rizika i 4,7 % [2,9 % – 6,4 %] za bolesnike srednjeg rizika) i opstaje do 10 godina. Međutim, stope ponavljanja bolesti za skupine srednjeg i visokog rizika nakon 5 godina hormonske terapije vrlo su slične.

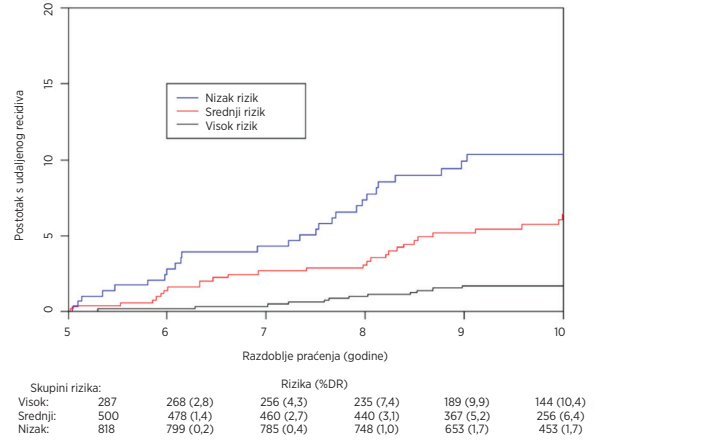
Slika 20A: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 0 do 5 godina: Bolesnici s negativnim čvorom



Sažetak podatka za Sliku 20A: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 0 do 5 godina: Bolesnici s negativnim čvorom

DR stope prema skupini rizika do pet godina dovršetka terapije [95 %-tni intervali pouzdanosti]		
Visok	Srednji	Nizak
13,2 % [9,6 % – 16,7 %]	4,7 % [2,9 % – 6,4 %]	2,1 % [1,1 % – 3,1 %]

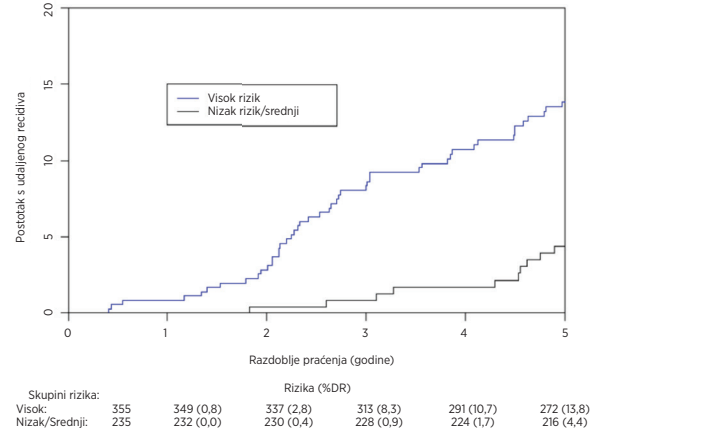
Slika 20B: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 5 do 10 godina: Bolesnici s negativnim čvorom



Sažetak podatka za Sliku 20B: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 5 do 10 godina: Bolesnici s negativnim čvorom

DR stope prema skupini rizika pet godina nakon dovršetka terapije bez udaljenog recidiva [95 %-tni intervali pouzdanosti]		
Visok	Srednji	Nizak
10,4 % [6,6 % – 14 %]	6,4 % [4,1 % – 8,7 %]	1,7 % [0,8 % – 2,6 %]

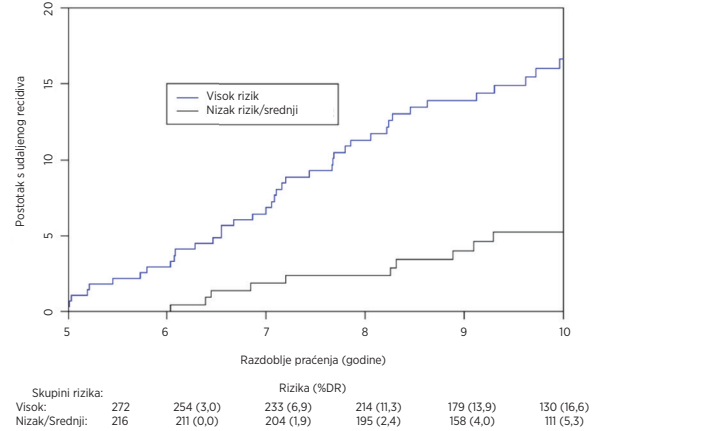
Slika 21A: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 0 do 5 godina: Bolesnici s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)



Sažetak podatka za Sliku 21A: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 0 do 5 godina: Bolesnici s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

DR stope prema skupini rizika do pet godina dovršetka terapije [95 %-tni intervali pouzdanosti]	
Visok	Nizak/Srednji
13,8 % [10,1 % – 17,4 %]	4,4 % [1,7 % – 7,0 %]

Slika 21B: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 5 do 10 godina: Bolesnici s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)



Sažetak podatka za Sliku 21B: Krivulja incidencije za udaljeni recidiv prema skupini rizika od 5 do 10 godina: Bolesnici s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

DR stope prema skupini rizika pet godina nakon dovršetka terapije bez udaljenog recidiva [95 %-tni intervali pouzdanosti]	
Visok	Nizak/Srednji
16,6 % [11,7 % – 21,3 %]	5,3 % [2,0 % – 8,4 %]

Zaključci kombinirane analize

Pokazano je da ROR ocjena dodaje značajne prognostičke podatke u razdoblju kasnog ponavljanja bolesti između 5 i 10 godina nakon postavljanja dijagnoze i iznad kliničkih varijabli u kombiniranom ispitivanju za bolesnike koji kroz pet godina nisu imali udaljeni recidiv. Upotrebom skupina rizika definiranih na osnovi za svaku kohortu specifičnu prema broju čvorova, pokazano je da skupine rizika klasificiraju cijeli set bolesnika u skupine sa značajno različitim rizikom od kasnog udaljenog recidiva. Slične prognostičke rezultate u raznim podskupinama pokazale su i analize skupine neprekidnog rizika i skupine rizika na temelju ROR ocjene. Nisu opažene materijalne razlike između rezultata s HER2-negativnim bolesnicima u usporedbi sa svim bolesnicima.

U ispitivanjima TransATAC i ABCSG-8 pokazano je da ROR dodaje značajne prognostičke podatke iznad standardnih kliničkih i terapijskih varijabli i kada je uključen kao neprekidna mjera ikada je uključen uz upotrebu tri unaprijed definirane skupine rizika. Dva su ispitivanja imala različite profile rizika u smislu da je stopa događaja bila viša u ispitivanju TransATAC u odnosu na ispitivanje ABCSG-8: to je jasno usporedbom DRFS-a (%) u kontrolnim skupinama ATAC (90,8 %) i ABCSG8 (92,5 %) prijavljenom u literaturi^{9, 10}. Ta je analiza kombinirala podatke iz dvaju ispitivanja s jednakom težinom kako bi generirala profile rizika za koje se očekuje da se mogu općenito primijeniti na ostale populacije bolesnika u odnosu na rezultate pojedinačnih ispitivanja.

Ispitivanje 1: Predviđanje rizika od udaljenog recidiva kod žena u postmenopauzi s rakom dojke u ranom stadiju pozitivnim na hormonski receptor, s negativnim čvorom ili pozitivnim čvorom, liječenima arimidexom ili tamoksifenom: ispitivanja TransATAC

Plan ispitivanja

Kliničko validacijsko ispitivanje osmišljeno je da potvrdi da ocjena rizika ponavljanja bolesti (ROR) daje dodatne prognostičke podatke za preživljenje bez udaljenog recidiva (DRFS) iznad standardnih kliničkih varijabli koristeći se svim dostupnim uzorcima bolesnika. Za to je ispitivanje upotrijebljena RNA izolirana iz FFPE tkiva tumora dojke iz podskupine bolesnika koji su sudjelovali u pokusu ATAC¹. U pokusu ATAC sudjelovalo je 9366 bolesnika u tri skupine (1:1:1) gdje su bolesnici randomizirani za primanje hormonske terapije od 1 mg anastrozola (tj. arimidex) i tamok- sifen placebo, 20 mg tamoksifena i anastrozol placebo ili kombinaciju tamoksifena/ arimidexa tijekom 5 godina. Kombinirana terapijska skupina otpuštena je nakon početne analize jer nije pokazala učinkovitost ili koristi podnošljivosti u odnosu na sam tamoksifen. Nedavno je objavljeno da 10-godišnji medijan praćenja monote- rapijske skupine pokusa ATAC zadovoljava zahtjeve FDA-a za ažuriranje informacije o sigurnosti i učinkovitosti⁹. Za bolesnike s pozitivnim hormonskim receptorom bilo je značajnog poboljšanja u DFS-u (HR = 0,86), RFS-u (HR = 0,79) i DRFS-u (HR = 0,85) za one bolesnike liječene anastrozolum u usporedbi s tamoksifenom u ovoj analizi. Apsolutna razlika u preživljenju bez udaljenog recidiva između anastrozola i tamoksifena povećana je tijekom vremena s 2,7 % nakon 5 godina na 4,3 % nakon 10 godina. Projekt TransATAC pokrenut je 2002. godine pod protokolom TA/01 za uspostavljanje banke tkiva iz arhivskih histopatoloških FFPE blokova od ATAC bolesnika retrospektivno¹¹.

Dobiveno je ukupno 2006 blokova od 4160 žena s rakom dojke pozitivnim na hormonski receptor koje su randomizirane u monoterapijske skupine pokusa ATAC. Od tih FFPE blokova, 1372 su prikupljena od bolesnika unutar Ujedinjenog Kraljevstva i sadržavala su dovoljno invazivnog tumora za analizu pomoću testa Genomic Health® Oncotype Dx^{®12}. Iz FFPE blokova određen je Oncotype Dx Recurrence Score® (RS), a rezultati ispitivanja klinički su potvrdili RS za procjenu preživljenja bez udaljenog recidiva u HR+ bolesnica u postmenopauzi s rakom dojke liječenih anastrozolum ili tamoksifenom. Preostala RNA iz ispitivanja Oncotype Dx otpremljena je u bolnicu Royal Marsden Hospital u Londonu gdje je pohranjena na -70 °C. Ukupno 1017 bolesnika iz ispitivanja Oncotype Dx imalo je > 500 ng preostale RNA te ih je NanoString ispitao kao dio kliničkog validacijskog ispitivanja NanoString.

To je ispitivanje upotrijebilo intrinzične podtipove generirane testom i procijenilo dvije verzije ROR ocjene upotrebom unaprijed definiranog sekvencijalnog pristupa. Izračunate su dvije različite ROR ocjene, svaka u rasponu od 0 do 100, koristeći se sa svih 50 gena testa kako je prethodno objavljeno² ili s podskupom od 46 gena. U svakom su slučaju izračunati koeficijenti iz Coxova modela koji uključuju Pearsonovu korelaciju s 50 ili 46 gena korištenih za izračunavanje svakog intrinzičnog podtipa, ocjene proliferacije i veličine tumora. Sve analize izvršene su na podacima nakon 10-godišnjeg praćenja.

Primarni ishod bio je preživljenje bez udaljenog recidiva (DRFS). To je definirano kao interval od postavljanja dijagnoze do udaljenog recidiva ili smrti zbog raka dojke. Sekundarni ishod bio je preživljenje bez recidiva (RFS). To je definirano kao interval od postavljanja dijagnoze do prvog recidiva (lokalni, regionalni ili udaljeni) ili smrti zbog raka dojke.

Uz upotrebu svih dostupnih uzoraka bolesnika, uključeni su multivarijacijski Coxovi modeli proporcionalne opasnosti (PH) radi procjene primarnog cilja u sekvencijalnim testovima ROR-a temeljenima na 50 i 46 gena. Model je uključivao standardne kliničke kovarijance (dob, gradus tumora, veličinu tumora, status čvora, adjuvantnu terapiju). Coxov model zatim je uklopljen i test omjera vjerojatnosti upotrijebljen je za testiranje je li ROR dodao statistički značajne ($\alpha = 0,05$) dodatne prognostičke podatke iznad onih sadržanih u ocjeni kliničkog tretmana (CTS). CTS je optimizirana kombinacija kliničkopatoloških faktora koje su razvili klinički istražitelji kao mjeru standardne patologije². Primarne analize ponovljene su za različite podskupove bolesnika (svi, negativan čvor, pozitivan čvor ili samo HER2-negativan) i ishode (DRFS ili RFS).

Za svakog bolesnika s negativnim i pozitivnim čvorom, Coxovi modeli (osim CTS-a) upotrijebljeni su za predviđanje 10-godišnjeg rizika od udaljenog recidiva kao funkcije ROR-a. Na temelju tih predviđanja modela definirane su tri skupine rizika:

Nizak rizik:	< 10 % šanse za DR do 10 godina
Srednji rizik:	10 – 20 % šanse za DR do 10 godina
Visok rizik:	> 20 % šanse za DR do 10 godina

Analiza

Za svaku skupinu rizika generirani su Kaplan-Meier dijagrami. Testovi omjera vjerojatnosti (upotrijebljeni za usporedbu prikladnosti dvaju statističkih modela) kako je opisano primarnom analizom izvršeni su za Genomic Health's Oncotype Dx test (RS, ocjena ponavljanja bolesti) i imunohistokemijski test primarnog istražitelja (IHC4). Ti su rezultati uspoređeni s onima dobivenima za ROR kako bi se odredio opseg u kojem svaki sustav bodovanja daje dodatne prognostičke informacije iznad CTS-a. O IHC4 rezultatima neće se dalje raspravljati budući da ih je teško usporediti s ostalim testovima jer je IHC4 test rađen s podacima iz ispitivanja TransATAC.

Tablica 26: Sažetak demografskih i kliničkih svojstava

Svojstva	Trenutačno ispitivanje (n = 1007)		Početno ispitivanje iz kojeg je dobivena RNA (n = 1231)	Nije uključena skupina s jednim sredstvom ispitivanja ATAC (n = 2929)
	Br. bolesnika	% bolesnika		
Status čvora				
Negativan	701	70 %	71 %	68 %
Pozitivan	268	27 %	25 %	25 %
Nepoznato	38	4 %	4 %	7 %
Veličina tumora				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1 – 2 cm	523	52 %		
2 – 3 cm	253	25 %	33 %	30 %
> 3 cm	93	9 %		
Gradus tumora				
Jažica	213	21 %	27 %	25 %
Umjereno	601	60 %	57 %	59 %
Slabo	193	19 %	16 %	17 %
Dob				
Sredina	64,4 godine		64,3	66,1

Tablica 27: Dodatna klinička svojstva

Svojstva	Broj bolesnika	% bolesnika
Podtip		
Nalik bazalnom	9	1 %
HER2-enriched	41	4 %
Luminalni A	692	69 %
Luminalni B	265	26 %
Obrada		
Anastrozol	513	51 %
Tamoksifen	494	49 %
Recidiv		
Bilo koji	210	21 %
Udaljen	160	16 %
Status HER2		
Negativan	888	88 %
Pozitivan	119	12 %

Rezultati

Testiranje primarne analiza pokazalo je da ROR ocjena daje dodatne prognostičke podatke za preživljenje bez udaljenog recidiva iznad kliničkih varijabli (CTS). Svi prijavljeni ROR podaci koji slijede temelje se na 46 gena jer je to osnova za ROR kako je prijavljeno testom Prosigna.

Tablica 28: Testiranje primarne analize za ROR

Nulti model	Alternativni model	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-vrijednost
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

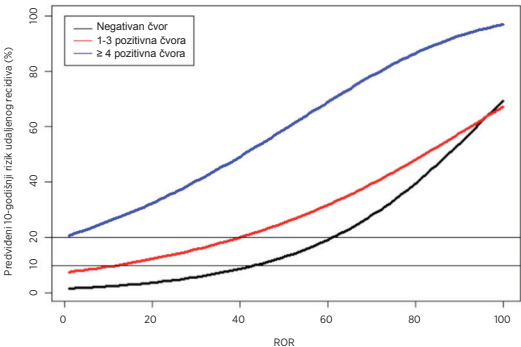
Sekundarne analize pokazale su da je ROR značajno povezan s preživljenjem bez udaljenog recidiva i da daje prognostičke podatke iznad CTS-a u više klinički relevantnih podskupina.

Tablica 29: Ponavljanje testiranja primarne analize za unaprijed definirane podskupine

Skupina ispitanika	Ishod	Br. bolesnika	Br. događaja	CTS+ROR u odnosu na CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-vrijednost
Sve	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negativni	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Negativni čvorovi	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Pozitivan čvor	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-negativan, negativan čvor	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

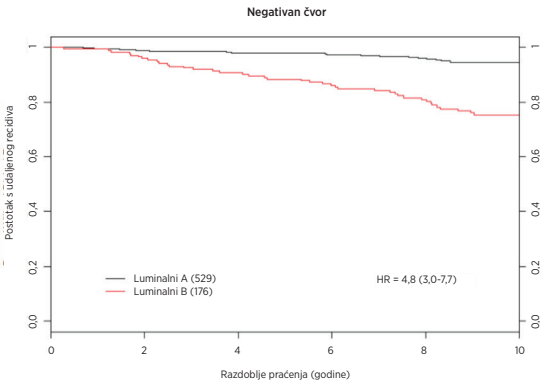
Primarna i sekundarna analiza pokazale su da je ROR kontinuirano povezan s preživljenjem bez udaljenog recidiva (DRFS) u svih bolesnika i u svim podskupinama.

Slika 22: Desetogodišnji predviđeni rizik od udaljenog recidiva procijenjen analizom ROR ocjene unutar skupine statusa čvora

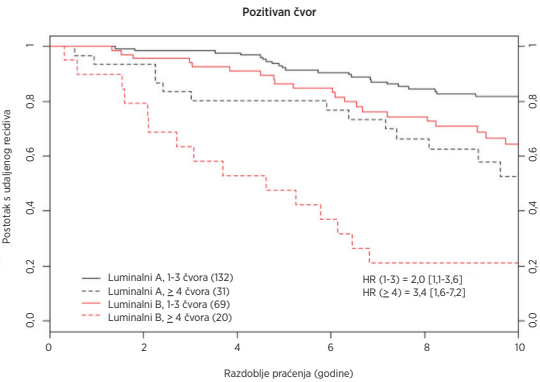


Sekundarna analiza pokazala je da su podtipovi luminalni A i luminalni B imali statistički značajno različite ishode unutar svake podskupne bolesnika definirane statusom čvora.

Slika 23: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS za bolesnike s negativnim čvorom prema intrinzičnoj skupini

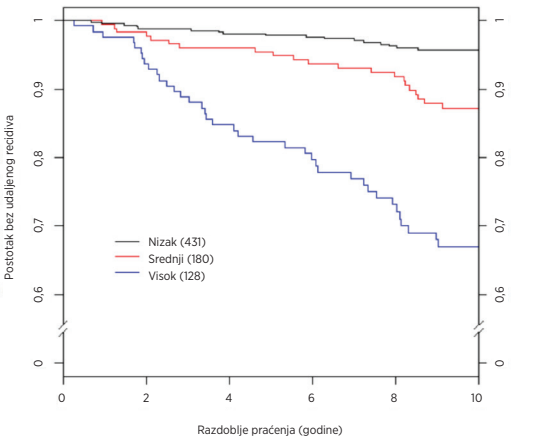


Slika 24: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS za bolesnike s pozitivnim čvorom prema intrinzičnoj skupini



Slike 25 i 26 pokazale su da je unutar svake kategorije čvora, apsolutni klinički rizik za one bolesnike za koje je predviđeno da su niskog rizika bio značajno različit od apsolutnog kliničko rizika bolesnika za koje je predviđeno da su visokog rizika: za bolesnike za koje je predviđeno da su niskog rizika opažene su 10-godišnje DR stope manje od 10 %, dok su za bolesnike za koje predviđeno da su visokog rizika opažene 10-godišnje DR stope veće od 30 %.

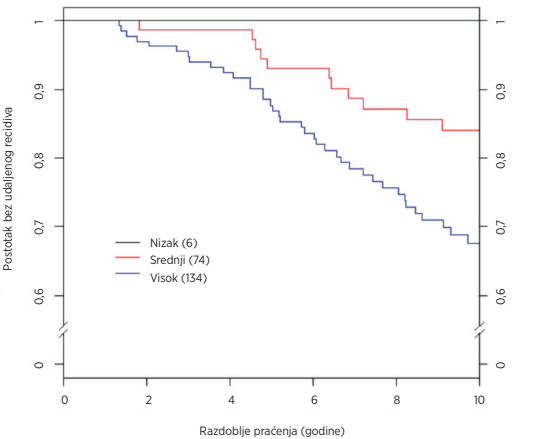
Slika 25: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom, osim CTS-a



Sažetak podatka za Sliku 25: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom, osim CTS-a

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	431 (58 %)	17	96 % [94 % - 98 %]
Srednji	180 (24 %)	22	86 % [81 % - 92 %]
Visok	128 (17 %)	38	67 % [59 % - 76 %]
Sveukupno	739 (100 %)	77	

Slika 26: DRFS prema skupini rizika za bolesnika s 1 do 3 pozitivna čvora bez CTS-a



Sažetak podatka za Sliku 26: DRFS prema skupini rizika za bolesnika s 1 do 3 pozitivna čvora bez CTS-a

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	6 (3 %)	0	100 % [N/A]
Srednji	74 (35 %)	11	84 % [76 % - 93 %]
Visok	134 (63 %)	38	68 % [59 % - 77 %]
Sveukupno	214 (100 %)	49	

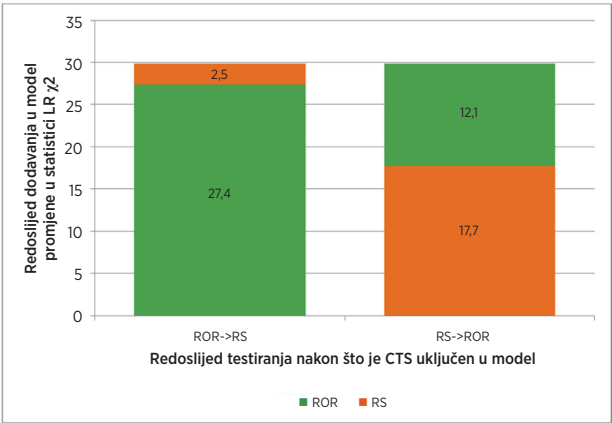
Usporedba ROR-a s RS-om

Od 1007 uzoraka s ROR ocjenama, rezultati testa Oncotype Dx bili su dostupni za svih 1007 uzoraka, ali IHC rezultati bili su dostupni samo za 940 uzoraka. Kako bi usporedba tih triju testova bila moguća, rezultati u ovome dijelu temelje se na 940 uzoraka koji su imali rezultate testiranja za sve tri metode (međutim IHC4 ovdje nije prijavljen). Testovi omjera vjerojatnosti predstavljeni su za dodavanje jedne varijable, pa kako bi dodani podaci bili statistički značajni ($\alpha = 0.05$), stat- stika promjene u 1 stupnju slobode χ^2 mora biti veća od 3,84. Slike u nastavku pokazuju podatke dodane kada je prognostički test dodan u drugi progno- stički test plus CTS u slijedu. Kod svakog dodavanja, dodani podaci mjere se promjenom u vrijednosti χ^2 .

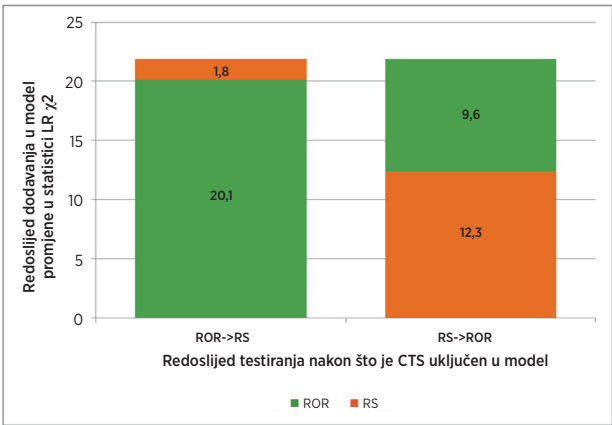
ROR dodan RS-u uz CTS: prognostički podaci

ROR añadido a RS, además de CTS: información de pronóstico

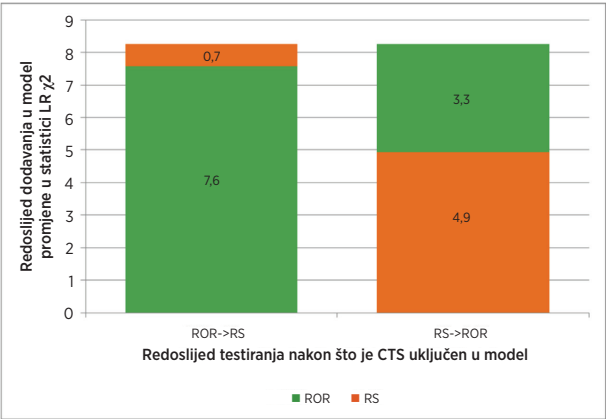
Slika 27: Prognostički podaci za DRFS iznad CTS-a kod svih bolesnika (n = 940)



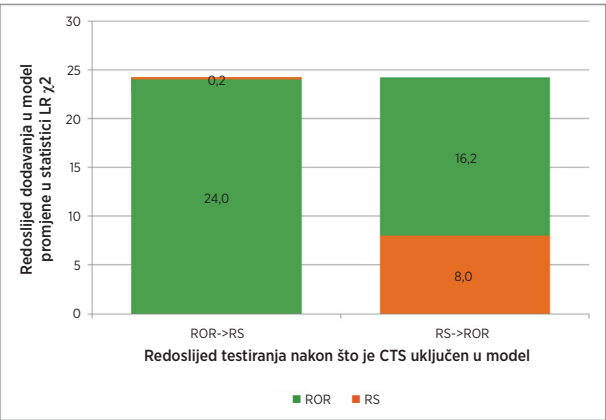
Slika 28: Prognostički podaci za DRFS iznad CTS-a kod bolesnika s negativnim čvorom (n = 683)



Slika 29: Prognostički podaci za DRFS iznad CTS-a kod bolesnika s pozitivnim čvorom (n = 257)



Slika 30: Prognostički podaci za DRFS iznad CTS-a kod bolesnika s negativnim čvorom HER2-negativnima (n = 649)



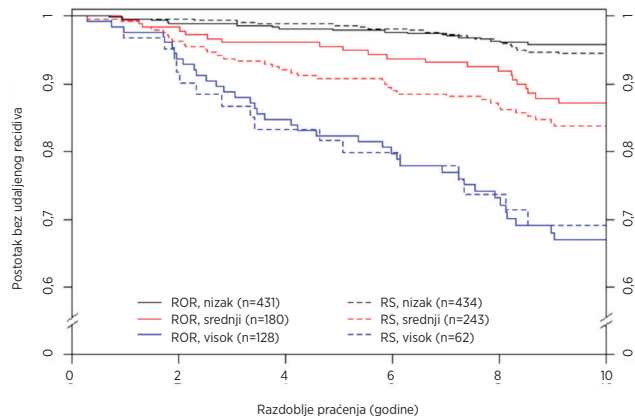
Slike od 27 do 30 pokazuju podatke dodane iznad CTS-a kada su dva progno- stička testa dodana u slijedu. Kod svakog dodavanja, dodani podaci mjere se promjenom u statističkoj vrijednosti χ^2 . Na primjer, kada je ROR bio prvi test dodan nakon uključivanja CTS-a (podaci svih bolesnika), promjena statističke vrijednosti χ^2 bila je 27,4. S CTS-om i ROR-om u modelu, dodavanjem RS-a dobivena je promjena u statističkoj vrijednosti χ^2 od 2,5, što nije značajno (kritična vrijednost za test χ^2 s 1 stupnjem slobode je 3,84); tj. kada su CTS i ROR oboje u modelu, RS ne dodaje značajne podatke. Međutim, ako je RS bio prvi dodani test, i dalje je bilo podataka u ROR-u koji nisu uključeni u kombinaciju CTS-a i RS-a. Oba testa pokazuju prognostički značaj kada su dodana CTS-u u bolesnika s pozitivnim čvorom, ali nijedan od testova ne pokazuje značajnost kao drugi dodani test, moguće zbog manje veličine uzorka. Na podskup HER2-negativnih bolesnika s pozitivnim čvorom, RS ne dodaje značajne prognostičke podatke u CTS + ROR. S druge strane, ROR dodaje značajne prognostičke podatke u CTS + RS.

ROR u odnosu na RS: rezultat skupina rizika

Kako bi se usporedio način kako su dva testa razdvojila bolesnike prema riziku, skupine rizika bile su definirane na temelju procjene svakog testa za rizik udaljenog recidiva nakon 10 godina unutar populacije ispitivanja TransATAC. Pragovi ocjene rizika za definiranje skupina rizika odabrani su za svaki test na temelju rezultata našeg ispitivanja TransATAC radi definiranja skupina rizika koje sadrže bolesnike s istim rizikom. Kako bi se dobile te usporedive skupine rizika, granične vrijednosti upotrijebljene za Oncotype DX razlikovale su se od onih koje je upotrebljavao Genomic Health. Za svaki test, skupina niskog rizika prospektivno je definirana kao bolesnici s procijenjenim rizikom manjim od 10 % za ponavljanje bolesti. Za svaki test, skupina srednjeg rizika prospektivno je definirana kao bolesnici s procijenjenim rizikom između 10 % i 20 % za ponav- ljanje bolesti. Za svaki test, skupina visokog rizika prospektivno je definirana kao bolesnici s procijenjenim rizikom većim od 20 % za ponavljanje bolesti. Na slici u nastavku sažete su veličine i ishodi skupina rizika definiranih svakim testom.

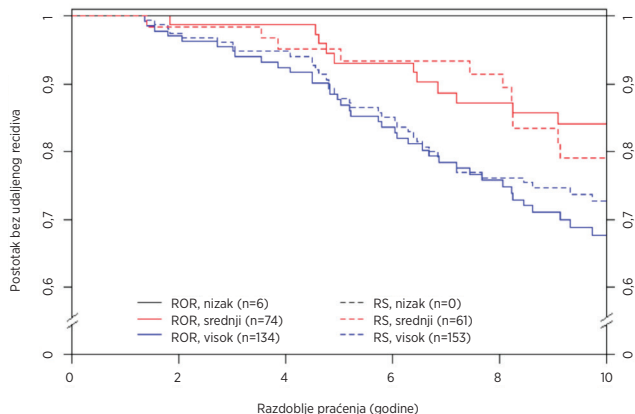
Slika 31 prikazuje rezultat koji je test Prosigna dodijelio za 26 % manje bolesnika u skupini srednjeg rizika u odnosu na Oncotype DX (180 bolesnika u odnosu na 243 bolesnika). Nadalje, test Prosigna dodijelio je više bolesnika u skupinu visokog rizika u odnosu na Oncotype DX, međutim, skupine niskog rizika i visokog rizika definirane svakim testom imaju slične ishode kako je prikazano preklapanjem Kaplan-Meierovih krivulja. To opažanje dovelo je neovisne istražitelje našeg ispitivanja TransATAC da zaključe kako je test Prosigna dodijelio manje bolesnika u skupinu srednjeg rizika u odnosu na Oncotype DX RS s ekvivalentnim ili većim odvajanjem između skupina niskog i visokog rizika.

Slika 31: ROR ocjena testa Prosigna identificirala je značajno više bolesnika s visokim rizikom i manje bolesnika sa srednjim rizikom u odnosu na RS ocjenu testa Oncotype DX za bolesnike s negativnim čvorom.



Kada se upotrebljava sam ROR u bolesnika s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora, bilo je 6 bolesnika za koje je predviđen rizik za udaljeni recidiv < 10 %. Nijedan od tih bolesnika nije imao događaje tijekom trajanja ispitivanja. Jedan od tih bolesnika bio je praćen 7,9 godina, a svi ostali nisu imali udaljeni recidiv najmanje 9,9 godina u razdoblju praćenja što ukazuje na to da su bolesnici s pozitivnim čvorom za koje je predviđeno da su niskog rizika zaista i bili niskog rizika. Log-Rank testovi nisu ovdje bili upotrijebljeni za usporedbu jer nije bilo skupine niskog rizika za RS.

Slika 32: Usporedba klasifikacije skupine rizika za DRFS u 10-godišnjem razdoblju bez upotrebe CTS-a: bolesnici s pozitivnim čvorom (1 – 3 čvora) (ROR u odnosu na RS)



Zaključci kliničkog ispitivanja 1

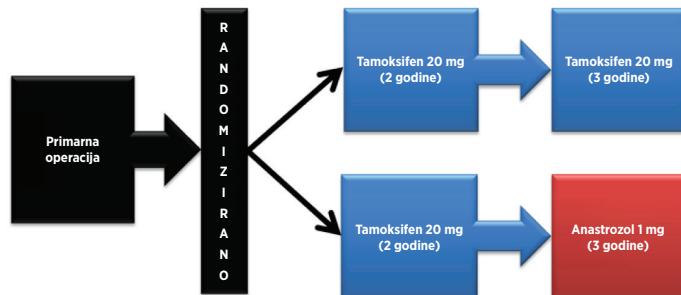
Primarna analiza pokazala je da ROR dodaje značajne prognostičke podatke iznad standardnih kliničkih kovarijanci (CTS) kod svih bolesnika i u svim unaprijed definiranim klinički značajnim podskupinama. Pokazano je da ROR dijeli bolesnike u 3 skupine rizika koje imaju statistički značajno različite ishode kod bolesnika s negativnim čvorom. Pokazano je da intrinzični podtipovi luminalni A i luminalni B imaju značajno različit DRFS i RFS bez obzira na status čvora. U usporedbi s prognostičkim pokazateljem RS-a (21-genska ocjena ponavljanja bolesti putem testa Oncotype Dx), ROR dodaje prognostičke podatke iznad RS-a u svih bolesnika i klinički relevantnih podskupina. Nadalje, u skupini s negativnim čvorom, ROR je udvostručio broj bolesnika dodijeljenih u skupinu visokog rizika i značajno je smanjio broj bolesnika dodijeljenih u skupinu srednjeg rizika bez smanjenja razlike u ishodima između skupina niskog i visokog rizika kada se uspoređuje s RS-om.

Ispitivanje 2: Prognoza za bolesnice u postmenopauzi s rakom dojke pozitivnim na hormonski receptor koje primaju samo adjuvantnu sistemsku hormonsku terapiju uz upotrebu testa Prosigna: ispitivanje ABCSG-8

Plan ispitivanja

Kohorta ispitivanja sastoji se od FFPE uzoraka tkiva tumora dojke prikupljenih i arhiviranih u ABCSG banku tumora od bolesnika uključenih u pokus ABCSG-8 između 1996. i 2004. godine¹³. Ukupno 3901 žena u postmenopauzi s rakom dojke ranog stadija pozitivnim na hormonski receptor randomizirana je prije dvogodišnjeg liječenja adjuvantnom terapijom tamoksifenom nakon čega slijede tri godine terapije lijekom Arimidex® (anastrozol) ili pet godina adjuvantne terapije tamoksifenom. Struktura liječenja u ispitivanju pokazana je na Slici 33.

Slika 33: Shematski plan ispitivanja pokusa ABCSG-8



Validacijska kohorta predstavlja dio kohorte ispitivanja ABCSG-8 koja se može procijeniti i za koju se uzorci tkiva mogu prikupiti iz retrospektivno arhivirane ABCSG banke tumora i za koju treba dobiti informirani pristanak ili da je bolesnik preminuo. Bolesnici koji udovoljavaju kriteriju podobnosti za izvorni pokus bili su isključeni samo zato što tkivo nije bilo dostupno za test tvrtke NanoString koji je trebalo provesti ili se nije mogao dobiti ponovni pristanak bolesnika. Svi uzorci s blokom tumora i dostupnim pristankom bolesnika bili su ispitani kao dio ovog ispitivanja.

To je ispitivanje upotrijebilo intrinzične podtipove generirane testom i procijenilo ROR ocjenu upotrebom unaprijed definiranog plana analize. ROR ocjena, koja je u rasponu od 0 do 100, izračunata je uz upotrebu 46-genskog podskupa iz 50 testnih gena koji su prethodno objavljeni². Koeficijenti za ROR izračunati su iz Coxova modela koji uključuju Pearsonovu korelaciju s 46 gena korištenih za izračunavanje svakog intrinzičnog podtipa, ocjene proliferacije i veličine vidljivog tumora. Sve analize izvršene su na podacima nakon maksimalnog praćenja.

Primarni ishod bio je preživljenje bez udaljenog recidiva (DRFS). To je definirano kao interval od postavljanja dijagnoze do udaljenog recidiva ili smrti zbog raka dojke. Sekundarni ishod bio je preživljenje bez recidiva (RFS). To je definirano kao interval od postavljanja dijagnoze do prvog recidiva (lokalni, regionalni ili udaljeni) ili smrti zbog raka dojke.

Uz upotrebu svih dostupnih uzoraka bolesnika, uklopljeni su multivarijacijski Coxovi modeli proporcionalne opasnosti (PH) radi procjene primarnog cilja u sekvencijalnim testovima ROR-a. Model je uključivao standardne kliničke kovarijance (dob, gradus tumora, veličinu vidljivog tumora, status čvora, adjuvantnu terapiju). Coxov model zatim je uključen i test omjera vjerojatnosti upotrijebljen je za testiranje je li ROR dodao statistički značajne ($\alpha = 0,05$) dodatne prognostičke podatke iznad onih sadržanih u ocjeni kliničkog tretmana (CTS). CTS je optimizirana kombinacija kliničkopatoloških faktora koji su razvijeni kao mjera standardne patologije¹². Primarne analize ponovljene su za različite podskupove bolesnika (svi, negativan čvor, pozitivan čvor ili samo HER2-negativan) i ishode (DRFS ili RFS).

Analiza

Korišten je sekvencijalni pristup u kojem je primarni znanstveni cilj bio dokazati da ROR dodaje značajne prognostičke podatke iznad standardnih kliničkih varijabli. Primarni cilj dodao je dodatni zahtjev za dokazivanje da kategorijska klasifikacija rizika u jednu od triju skupina (nizak/srednji/visok) dodaje značajne prognostičke podatke iznad standardnih kliničkih varijabli. Kako bi se udovoljilo tom zahtjevu, trebalo je dokazati sljedeće:

- Pokazati da kontinuirana ROR ocjena dodaje prognostičku vrijednost iznad standardnih kliničkih varijabli
- Ako je odbačena nulta hipoteza da nema prognostičkih podataka, pokazuje kategorije rizika temeljene na ROR-u i prognostičku vrijednost iznad standardnih kliničkih varijabli

Uz upotrebu svih dostupnih uzoraka bolesnik, uključeni su multivarijacijski Coxovi modeli proporcionalne opasnosti (PH) radi procjene primarnog cilja u sekvencijalnim testovima ROR-a nakon čega slijede unaprijed definirane kategorije rizika temeljene na ROR-u. Modeli su uključivali sljedeće kategoričke standardne kliničke kovarijance (s mogućim vrijednostima):

- dob (≥ 65 ili < 65)
- gradus (G1 ili G2/GX)
- veličina vidljivog tumora (T1, T2/T3)
- status čvora (N0, N+(1 – 3), N+(≥ 4))
- adjuvantna terapija (samo tamoksifen ili tamoksifen → anastrozol)

gdje N0 predstavlja bolesnike s negativnim čvorom, N+(1 – 3) predstavlja bolesnike s pozitivnim čvorom s 1 – 3 pozitivna čvora i N+(≥ 4) predstavlja bolesnike s pozitivnim čvorom s 4 ili više pozitivnih čvorova. T1 predstavlja tumor ≤ 2 cm poprečno, T2 predstavlja tumor veći od 2 cm ali ne veći od 5 cm poprečno i T3 predstavlja tumor veći od 5 cm poprečno. U ispitivanju je bilo samo 14 T3 uzoraka tako da su oni kombinirani s T2 uzorcima. Dobro diferencirani (G1) tumori uspoređeni su s kombinacijom umjereno diferenciranih (G2) i GX lobularnih tumora. GX lobularni tumori tretirani su kao G2 tumori u svrhu analize jer su G2 tumori najčešći gradus u toj populaciji bolesnika.

Te kovarijance unesene su u model u obliku ocjene kliničkog tretmana (CTS). Kako bi se dobio CTS, upotrijebljen je sljedeći model:

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

Gdje z predstavlja kliničke varijable i varijable liječenja navedene iznad i CTS je definiran upotrebom procjene vrijednosti γ dobivene gore; tj. CTS = $\sum_j z_j \gamma_j$.

Pretpostavka proporcionalne opasnosti ispitana je pomoću Schoenfeldovih reziduala.

Bolesnici uključeni u validacijskog ispitivanje imali su slična svojstva kao oni u izvornom ispitivanju ACBSG-8.

Tablica 30: Sažetak kliničkih svojstava

Svojstva	Vrijednost	Uključeno (n = 1478)		Nije uključeno (n = 2236)		Sveukupno (n = 3714)	
		br.	%	br.	%	br.	%
Obrada	Samo tamoksifen	741	50,1 %	1108	49,3 %	1849	49,8 %
	Tamoksifen → anastrozol	737	49,9 %	1128	50,2 %	1865	50,2 %
ER status	Negativan	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Pozitivan	1464	99,1 %	2199	98,3 %	3663	98,6 %
	Nepoznato	0	0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Gradus	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 %
Status čvora	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 status	Negativan	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Pozitivan	1218	82,4 %	1805	80,4 %	3023	81,4 %
	Nepoznato	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Stadij tumora	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 %
Dob	Medijan	63		NA		64	
	Raspon	41-79				41 – 80	

* Uključuje jednog bolesnika s > 9 pozitivnih čvorova

Tablica 31: Dodatna klinička svojstva

Svojstva	Vrijednost	Broj bolesnika	% bolesnika
Intrinzični podtip NanoString	Luminalni A	1004	67,9 %
	Luminalni B	418	28,3 %
	HER2-enriched	48	3,2 %
	Nalik bazalnom	8	0,5 %
Recidiv	Udaljen	155	10,5 %
	Bilo koji	194	13,1 %
Status HER2	Negativan	1397	94,5 %
	Pozitivan	77	5,2 %
	Nepoznato	4	0,3 %

Rezultati

Od 1620 tkiva dostupnih za testiranje, 25 (1,5 %) nije prošlo unaprijed definirani patološki pregled adekvatnosti tumora, 73 od 1595 uzoraka tkiva (4,6 %) s vijabilnim invazivnim tkivom nije prošlo unaprijed definirane specifikacije kontrole kvalitete za ekstrahiranu RNA, a 44 od 1522 RNA uzoraka (2,9 %) nije prošlo specifikacije kontrole kvalitete za rezultate testa Prosigna što ostavlja ukupno 1478 (91,2 %) dostupnih za analizu.

Od 1478 bolesnika dostupnih za analizu, 155 je imalo udaljeni recidiv i 194 je imalo lokalni ili udaljeni recidiv ili smrt zbog raka dojke. Medijan razdoblja praćenja za pokus bio je 10 godina.

Testiranje primarne analize pokazalo je da ROR ocjena daje značajne dodatne prognostičke podatke za preživljenje bez udaljenog recidiva iznad kliničkih varijabli (CTS).

Tablica 32: Sažetak testiranja primarne analize

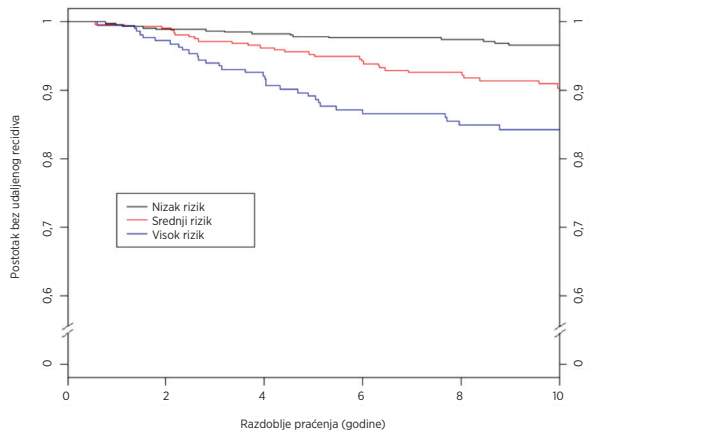
Nulti model	Alternativni model	ΔLR χ²	χ² Kritična vrijednost (stupnjevi slobode)	χ² p-vrijednost
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + skupina rizika	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Sekundarne analize pokazale su da je ROR značajno povezan s preživljenjem bez udaljenog recidiva i da dodaje prognostičke podatke iznad CTS-a u više klinički relevantnih podskupina.

Tablica 33: Ponavljanje testiranja primarne analize za unaprijed definirane podskupine

Skupina ispitnika	Br. bolesnika	Br. događaja	CTS+ROR u odnosu na CTS	CTS+skupina rizika u odnosu na CTS
			ΔLR χ² (krit. vrijednost = 3,84)	ΔLR χ² (krit. vrijednost = 5,99)
Sve	1478	155	53,49	34,12
HER2-negativni	1397	145	47,50	29,94
N0	1.047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negativni	984	79	21,69	20,32
N+(1 – 3)	382	59	25,99	19,94
N+(1 – 3), HER2-negativni	367	56	22,75	18,75

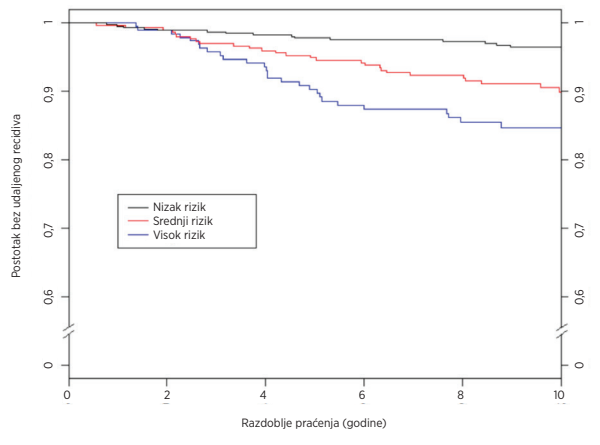
Figura 34: DRFS según el Skupini rizika: para pacientes con Negativan čvor



Slika 34: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4 % – 97,9 %]
Srednji	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3 % – 93,3 %]
Visok	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4 % – 88,6 %]
Sveukupno	1.047 (100 %)	75	

Slika 35: DRFS prema skupini rizika za HER2-negativne bolesnike s negativnim čvorom

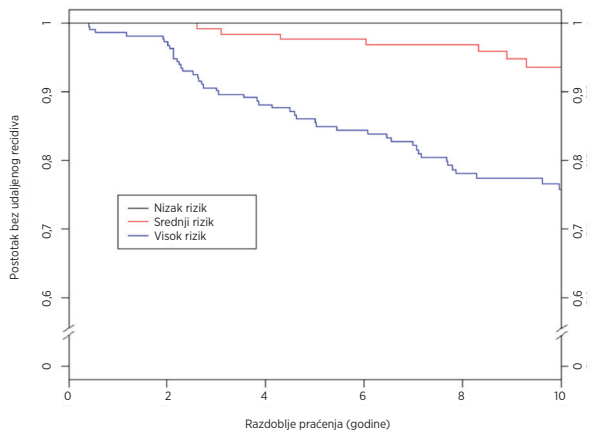


Sažetak podatka za Sliku 35: DRFS prema skupini rizika za HER2-negativne bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3 % - 97,9 %]
Srednji	311 (32 %)	27	90 % [85,6 % - 93,1 %]
Visok	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4 % - 89,3 %]
Sveukupno	984 (100 %)	69	

Na Slici 36 prikazan je Kaplan-Meierov dijagram prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora), a na Slici 37 prikazani su isti dijagrami za HER2-negativne bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora). Rezultati sa i bez HER2-pozitivnih bolesnika slični su.

Slika 36: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

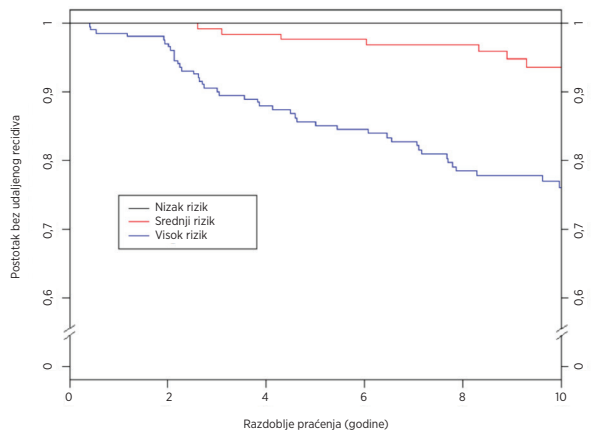


Sažetak podatka za Sliku 36: DRFS prema skupini rizika za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Srednji	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9 % - 97 %]
Visok	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9 % - 81,4 %]
Sveukupno	382 (100 %)	53	

* Interval pouzdanosti procijenjen Clopper-Pearsonovom metodom

Slika 37: DRFS prema skupini rizika za HER2-negativne bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)



Sažetak podatka za Sliku 37 DRFS prema skupini rizika za HER2-negativne bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

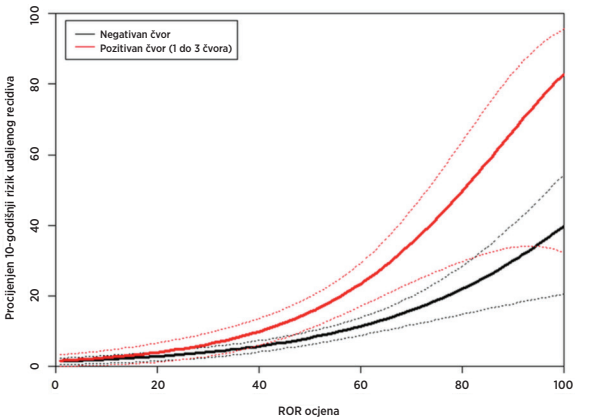
Skupina rizika	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Nizak	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Srednji	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8 % - 96,9 %]
Visok	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0 % - 81,8 %]
Sveukupno	367 (100 %)	50	

* Interval pouzdanosti procijenjen Clopper-Pearsonovom metodom.

Odnos između ROR-a i predviđanja rizika

Na Slici 38 prikazan je 10-godišnji rizik od udaljenog recidiva kao funkcija ROR ocjene s 95 %-tnim intervalima pouzdanosti na temelju zasebnih Coxovih modela proporcionalne opasnosti za svaku od skupina bolesnika s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora). Na bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora), pretpostavka proporcionalne opasnosti prekršena je kada se uklopi kroz cijeli raspon. Ovdje prikazana krivulja za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) upotrebljava bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) s ROR ocjenama u rasponu od 0 do 80 za koje je udovoljena pretpostavka proporcionalne opasnosti.

Slika 38: Desetogodišnja procijenjena opasnost od udaljenog recidiva prema kategoriji čvora s 95 %-tnim intervalima pouzdanosti



Unutar svake podskupine, apsolutni klinički rizik za one bolesnike dodijeljene u kategoriju niskog rizika značajno se razlikovao od apsolutnog kliničkog rizika za bolesnike dodijeljene u kategoriju visokog rizika.

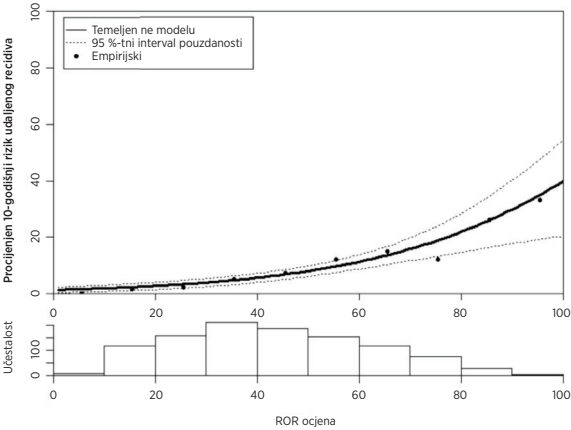
U Tablici 34 prikazana je distribucija bolesnika s negativnim čvorom prema 10-jediničnim ROR nizovima. Prikazan je i 10-godišnji DR rizik.

Tablica 34: Distribucija bolesnika s negativnim čvorom prema 10-jediničnom ROR rasponu

ROR raspon	Broj bolesnika	Postotak bolesnika	10-godišnja DR opasnost (empirijski)
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 %
Sveukupno	1.047	100 %	

Na Slici 39 prikazana je krivulja temeljena na modelu za bolesnike s negativnim čvorom zajedno s empirijski procijenjenom stopom preživljenja u 10 godina za 10 nizova gdje se svaki niz sastoji od svih bolesnika unutar 10-jediničnog ROR raspona (1 do 10, 11 do 20 itd.). Ispod krivulje nalazi se histogram koji prikazuje učestalost distribucije prema nizu.

Slika 39: Usporedba procjena temeljenih na modelu i empirijskih procjena za deseto-godišnji DR rizik za bolesnike s negativnim čvorom s distribucijom ROR ocjene prikazanom ispod



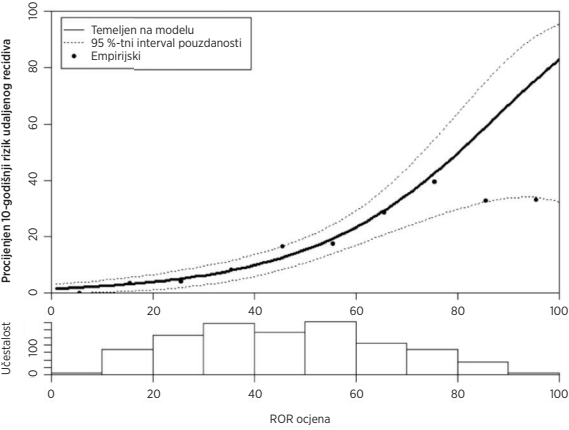
Za bolesnike s negativnim čvorom, procjene proporcionalne opasnosti temeljene na modelu bile su slične empirijskim procjenama kroz cijeli raspon. U Tablici 35 prikazana je distribucija bolesnika s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) prema 10-jediničnim ROR nizovima. Prikazan je i 10-godišnji DR rizik.

Tablica 35: Distribucija bolesnika s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) prema 10-jediničnom ROR rasponu

ROR raspon	Broj bolesnika	Postotak bolesnika	10-godišnja DR opasnost (empirijski)
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 %
Sveukupno	382	100 %	

Na Slici 40 prikazana je krivulja temeljena na modelu (uz upotrebu bolesnika s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) s ROR ocjenama ≤ 80) za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) zajedno s empirijski procijenjenom stopom preživljenja u 10 godina za 10 nizova gdje se svaki niz sastoji od svih bolesnika unutar 10-jediničnog ROR raspona (1 do 10, 11 do 20 itd.). Ispod krivulje nalazi se histogram koji prikazuje učestalost distribucije prema nizu.

Slika 40: Usporedba procjena temeljenih na modelu i empirijskih procjena za deseto-godišnji DR rizik za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) s distribucijom ROR ocjena prikazanom ispod



I Tablica 35 i Slika 40 prikazuju ravnanje opaženog 10-godišnjeg rizika na vrhu ROR raspona što dovodi do neuspjeha pretpostavke proporcionalne opasnosti. Međutim, treba napomenuti da su veličine uzorka u dva niza iznad 80 obje bile male za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) (17 bolesnika od 81 do 90 i samo 3 od 91 do 100).

Usporedba intrinzičnih podtipova luminalni A i luminalni B

Većina podtipova u ispitivanju (96 %) bila je ili luminalni A ili luminalni B što nije bilo neočekivano jer ti intrinzični podtipovi prevladavaju u bolesnika pozitivnih na hormonski receptor¹².

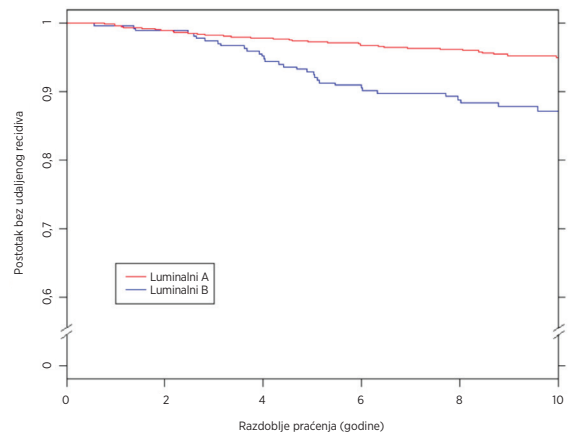
Tablica 36 prikazuje rezultate testa omjera vjerojatnosti za prikazivanje dodatne prognostičke vrijednosti za DRFS koju razlika između luminalnog A i luminalnog B podtipa dodaje iznad CTS-a. U tablici je također prikazan omjer opasnosti usporedbom bolesnika s luminalnim A i luminalnim B podtipom. U sve tri skupine bio je značajno niži rizik za udaljeni recidiv za bolesnike s luminalnim A podtipom.

Tablica 36. Test omjera vjerojatnosti za DRFS prognostičku vrijednost luminalnih podtipova

Podskupina	br. bolesnika	br. događaja	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-vrijednost	Omjer opasnosti za LumA: LumB (95 %-tni CI)
Sve	1422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30– 0,59]
N0	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]

Na Slici 41 prikazana je usporedba DRFS-a prema luminalnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom, a na Slici 42 prikazana je ista usporedba za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora). Za obje je skupina postojala značajna razlika između DRFS-a bolesnika s luminalnim A i luminalnim B podtipom.

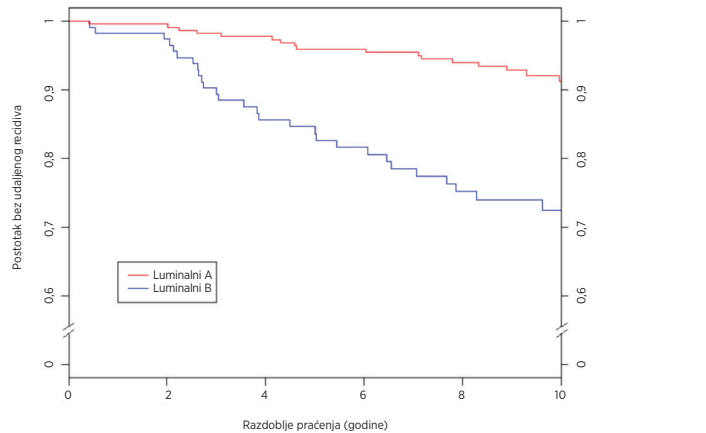
Slika 41: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom



Sažetak podatka za Sliku 41: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s negativnim čvorom

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni CI]
Luminalni A	725	32	95,1 % [93,4 % - 96,3 %]
Luminalni B	284	32	87,2 % [83,2 % - 90,3 %]
Sveukupno	1009	64	

Slika 42: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)



Sažetak podatka za Sliku 42: Kaplan-Meierova krivulja za DRFS prema intrinzičnom podtipu za bolesnike s pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora)

Skupina rizika	Broj bolesnika	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
Luminalni A	248	17	91,3 % [87,2 % - 94,2 %]
Luminalni B	118	28	72,5 % [64,2 % - 79,1 %]
Sveukupno	366	45	

U Tablici 37 prikazane su 10-godišnje RFS stope prema luminalnom podtipu za skupine s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora).

Tablica 37: Desetogodišnje RFS stope prema skupini čvora i luminalnom podtipu

Status čvora	Luminalni podtip	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	Procijenjeni postotak bez udaljenog recidiva nakon 10 godina [95 %-tni interval pouzdanosti (CI)]
N0	Luminalni A	725 (72)	44	93,0 % [91,1 % - 94,5 %]
	Luminalni B	284 (28)	44	82,2 % [77,6 % - 85,9 %]
N+(1 - 3)	Luminalni A	248 (68)	21	89,1 % [84,7 % - 92,4 %]
	Luminalni B	118 (32)	30	71,6 % [62,2 % - 77,4 %]

Za svaku populaciju bolesnika s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora) razlika između bolesnika s luminalnim A i luminalnim B podtipom bila je značajna.

Zaključci kliničkog ispitivanja 2

Pokazano je da ROR dodaje značajne prognostičke podatke iznad standardnih kliničkih i terapijskih varijabli i kada je uključen kao neprekidna mjera i kada je uključen uz upotrebu tri unaprijed definirane skupine rizika. Skupina niskog rizika imala je 10-godišnji DRFS iznad 90 % kako je predviđeno. Skupina visokog rizika imala je 10-godišnji DRFS od 80 % što je više od očekivanog. Očekivalo se da će biti dokazivo niže od 80 %. Granične vrijednosti koje su korištene za definiranje skupina rizika temeljile su se na kohorti TransATAC koja je većeg rizika od trenutne kohorte, dovodeći do sveukupno nižeg rizika „skupine visokog rizika“ nego što je bilo očekivano. ROR (neprekidan i temeljen ne skupini) pokazao je slične prognostičke podatke u raznim podskupinama. Neprekidan model rizika blizak je empirijskim stopama ponavljanja bolesti u obje populacije bolesnika, s negativnim čvorom i pozitivnim čvorom (1 do 3 čvora). Većina bolesnika (96 %) u ispitivanju imala je tumore jednog od dvaju luminalnih podtipova (luminalni A ili luminalni B). U svim skupinama statusa čvora, razlika između luminalnog A i luminalnog B podtipa dodala je prognostičke podatke u vezi s DRFS-om.

Sažetak kombiniranih kliničkih ispitivanja

Rezultati se mogu generalizirati za distribucijsku upotrebu jer su uzorci poslani u različite laboratorije u dva klinička validacijska ispitivanja te su tamo analizirani. Pokazano je da ROR dodaje značajne prognostičke podatke za 10-godišnji DRFS iznad standardnih kliničkih i terapijskih varijabli i kada je uključen kao neprekidna mjera i kada je uključen uz upotrebu tri unaprijed definirane skupine rizika. Nadalje, u post-hoc analizi, ROR je dodao značajne podatke za DRFS nakon 5 godina iznad standardnih kliničkih varijabli za sve bolesnike. ROR (neprekidan i temeljen ne skupini) pokazao je slične prognostičke podatke u raznim podskupinama. Ograničene analize također su provedene uz upotrebu RFS-a. ROR klase također su mogle definirati tri skupine rizika s jasnim RFS-om. Za oba je ispitivanja postojala značajna razlika između DRFS-a bolesnika s luminalnim A i luminalnim B podtipom, neovisno o statusu čvora.

17 LITERATURA

- 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.
- 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.

18 SIMBOLI I DEFINICIJE

 – Proizvođač

EC REP – Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici

IVD – *In vitro* dijagnostički medicinski proizvod

 **i** – Pogledajte upute za upotrebu

CE – CE oznaka

LOT – Broj serije/broj partije

REF – Kataloški ili referentni broj

 – Sadržaj je dostatan za <n> testova

 – Raspon temperature za uvjete skladištenja

 – Donja granica temperature za uvjete skladištenja

 – Gornja granica temperature za uvjete skladištenja

 – Upotrijebiti do/Rok trajanja

 – Ova strana prema gore

Sobna temp. = Sobna temperatura

HYB = hibridizacija

Odricanje od odgovornosti

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

© 2025 Veracyte, Inc. i pridružene tvrtke. Sva prava pridržana. Veracyte, logotip Veracyte, Prosigna i logotip Prosigna zaštitni su znakovi tvrtke Veracyte, Inc. i njezinih pridruženih tvrtki. nCounter je zaštitni znak tvrtke NanoString Technologies, Inc. i koristi se pod licencom.

19 INFORMACIJE O KONTAKTU

 Informacije o kontaktu za SAD:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080 USA
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com

EC REP

Ovlašteni zastupnik u EU-u:
Veracyte Global, B.V.
Fascinatia Boulevard 216
3065WB Rotterdam
NETHERLANDS

Globalne informacije o kontaktu:
E-adresa tehničke podrška: DxSupport@Veracyte.com
E-adresa za informacije o proizvodu: info@prosigna.com
Internetska stranica: www.prosigna.com