

Prospect

Testul Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature



Versionea 01, creată la 09-2023



1 - 10 teste

Condiții de depozitare

	-20 °C A se depozita la temperaturi de -20° C sau mai mici	Cartușe de test Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature
	-80 °C A se depozita la temperaturi de -80° C sau mai mici	CodeSet test Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature
	+25 °C A se depozita la temperatura camerei	Pachet de pregătire a testului Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature
	+8 °C A se depozita la temperaturi de +4 °C	Plăci de pregătire a testului Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature

CUPRINS

1	UTILIZARE PRECONIZATA / SCOP	1
2	REZUMAT AL SISTEMULUI DE TESTARE	1
2.1	Principiile sistemului de analiză nCounter	2
2.2	Principii ale algoritmului Prosigna pentru calculul valorilor rezultate	2
3	REACTIVI ȘI ECHIPAMENTE FURNIZATE	2
3.1	Prezentare generală a setului Prosigna	2
3.2	Conținutul setului Prosigna pentru un kit Prosigna de 1, 2, 3, 4 sau 10 teste	3
4	AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII	3
5	CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND ANALIZELE	3
5.1	Prelucrarea țesuturilor	3
5.2	Efectuarea testului Prosigna	4
6	INFORMAȚII PRIVIND FORMAREA PROFESIONISTĂ	4
7	MANIPULAREA DEȘEURILOR	4
8	DEPOZITARE ȘI MANIPULARE (REACTIVI)	4
9	INSTRUMENTE NECESARE PENTRU PROSIGNA	4
10	REACTIVI ȘI ECHIPAMENTE NECESARE, DAR CARE NU SUNT FURNIZATE	4
10.1	Materiale	4
10.2	Echipament	4
10.3	Specificațiile echipamentului	4
11	RECOLTAREA ȘI PRELUCRAREA PROBELOR	5
11.1	Cerințe privind probele de țesut și examinarea patologică	5
11.2	Recoltarea și depozitarea probelor	5
11.3	Pregătirea lamelor	5
11.4	Procesarea lamelor	5
11.5	Izolarea ARN-ului	6
11.6	Măsurarea concentrației și a calității ARN-ului	6
11.7	Procedura de testare	7
12	DEPANARE ȘI EȘECURI DE TESTARE	9
13	REZULTATELE TESTULUI	9
13.1	Subtipuri intrinseci	9
13.2	Scorul ROR	10
13.3	Probabilitatea de recidivă la distanță de 10 ani	10
13.4	Clasificarea riscurilor	10
13.5	Control al calității	10
14	LIMITĂRI DE PROCEDURI	10
15	VALORI PRECONIZATE	11
15.1	Intervalul ROR în funcție de subtip	11
15.2	Frecvența scorului ROR în funcție de statusul ganglionar	11
15.3	Supraviețuirea fără recidivă la distanță în funcție de clasificarea riscului	11

16	CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ	12
16.1	Precizia și reproductibilitatea analitice	12
16.2	Sensibilitate / informații ARN	13
16.3	Testarea interferențelor	13
16.4	Performanță clinică	14
17	BIBLIOGRAFIE	25
18	SIMBOLURI ȘI DEFINIȚII	26
19	INFORMAȚII DE CONTACT	26

1 UTILIZARE PRECONIZATA / SCOP

Testul Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature este un test de diagnosticare *in vitro* care utilizează profilul de expresie genetică al celulelor din țesutul cancerului de sân pentru a evalua riscul de recidivă la distanță al pacientului. Testul măsoară profilul de expresie genică folosind ARN extras din țesutul tumoral mamar fixat în formol și încastrat în parafină (FFPE). Datele privind expresia genică sunt ponderate împreună cu variabilele clinice pentru a genera atât un subtip (luminal A, luminal B, HER2-îmbogățit sau bazal), cât și un scor care indică probabilitatea de recidivă la distanță a bolii. Testul se efectuează pe sistemul de analiză nCounter® folosind țesut de tumoare mamară FFPE diagnosticată anterior ca și carcinom mamar invaziv.

Testul Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature este indicat la pacienții cu cancer de sân care au suferit o mastectomie sau o terapie de conservare a sânelor împreună cu un tratament locoregional în conformitate cu standardul de îngrijire, fie ca:

- Un indicator de prognostic pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță la 10 ani la femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân pozitiv la receptorii hormonali (HR+), cu ganglioni limfatici negativi, în stadiul I sau II, care urmează să fie tratate doar cu terapie endocrină adjuvantă, atunci când este utilizată împreună cu alți factori clinicopatologici.
- Un indicator de prognostic pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță la 10 ani la femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân pozitiv la receptorii hormonali (HR+), cu ganglioni limfatici negativi (1-3 ganglioni pozitivi sau 4 ganglioni pozitivi), în stadiul I sau II, care urmează să fie tratate doar cu terapie endocrină adjuvantă, atunci când este utilizată împreună cu alți factori clinicopatologici.

2 REZUMAT AL SISTEMULUI DE TESTARE

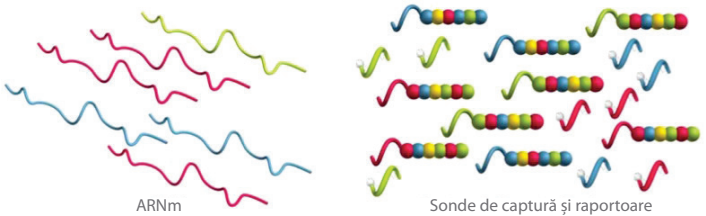
Sistemul de analiză nCounter oferă măsurători directe și multiplexe ale expresiei genice prin citirea digitală a abundenței relative a transcripților ARNm, folosind următoarele etape: 1) hibridizarea ARN-ului cu sonde fluorescente de raportare și sonde de captură, 2) purificarea complexelor țintă/sondă cu ajutorul plăcilor de pregătire nCounter care conțin reactivii necesari pentru procesarea posthibridizare și imobilizarea pe cartușul nCounter de pe stația de pregătire nCounter și 3) analiza cartușului nCounter pe analizorul digital nCounter pentru a furniza un rezultat al testului¹. Atât sondele de captare, cât și cele de raportare conțin secvențe unice de sonde de ADN pentru hibridizarea și purificarea țintelor. Sondele de captură și de raportare sunt combinate cu controalele pozitive și negative pentru a forma CodeSet. Prosigna măsoară simultan nivelurile de expresie a 50 de gene utilizate pentru algoritmul de clasificare a subtipurilor intrinseci², 8 gene gazdă utilizate pentru normalizarea semnalului, 6 controale pozitive și 8 controale negative într-o singură reacție de hibridizare folosind sonde de acid nucleic concepute special pentru genele respective. De asemenea, în setul Prosigna este inclusă și o probă de referință constând din ținte ARN transcrise *in vitro* pentru fiecare dintre cele 58 de gene. Proba de referință este testată cu fiecare lot de probe de ARN ale pacientului pentru a califica testul și a normaliza semnalul de la fiecare genă.

Testul Prosigna se efectuează pe ARN izolat din țesuturi tumorale mamare FFPE. Un medic anatomopatolog examinează o lamă colorată cu hematoxină și eozină (H&E) și identifică (și marchează) zona de carcinom mamar invaziv adecvată pentru test. Medicul anatomopatolog măsoară, de asemenea, suprafața tumorii, care determină numărul de lame necolorate necesare pentru test, precum și celularitatea tumorii pentru a se asigura că există suficient țesut tumoral pentru test. Un tehnician calificat operează o macrodisecție a zonei de pe lamele necolorate care corespunde zonei tumorale marcate pe lamele colorate cu H&E și izolează ARN-ul din țesut. ARN-ul izolat este apoi testat cu ajutorul sistemului de analiză nCounter pentru a obține rezultatele testului, inclusiv subtipul intrinsec, scorul ROR (Risk of Recurrence) și categoria de risc.

2.1 Principiile sistemului de analiză nCounter

Sistemul de analiză nCounter utilizează perechi de sonde specifice unei gene (Figura 1) care hibridizează direct în proba de ARNm în soluție, eliminând reacțiile enzimatice care ar putea introduce distorsiuni în rezultate. În prima etapă a testului, sondele de ADN sunt hibridizate direct pe o regiune de 70-100 de perechi de baze din proba de ARN în soluție. Sonda raportoare fluorescentă constă dintr-o secvență de sondă de 35-50 de baze care este complementară cu ARNm țintă și o secvență unică de ADN backbone care hibridizează în șase segmente de ARN marcate cu unul dintre cei patru coloranți fluorescenți: roșu (R), galben (Y), albastru (B) sau verde (G). Segmentele fluorescente creează un „cod de culoare” fluorescent cu șase poziții/patru culori, care este unic pentru fiecare țintă. O sondă de captare separată constă dintr-o secvență de sondă de 35-50 de baze care este complementară cu ARNm-țintă și cu biotina, care este utilizată pentru imobilizarea pe o lamă acoperită cu streptavidină.

Figura 1: Hibridizarea CodeSet în ARNm



După hibridizare, toate etapele de purificare a probei sunt automatizate pe stația de pregătire nCounter. În primul rând, se elimină excesul de sonde de captare și raportoare (Figura 2) folosind etape succesive de captare a perlelor magnetice, urmate de legarea complexelor sondă-țintă la situsuri aleatorii de pe suprafața cartușului nCounter prin intermediul unei legături streptavidină-biotină (Figura 3). În cele din urmă, complexele sondă/țintă sunt aliniate și imobilizate (Figura 4) în cartușul nCounter.

Figura 2: Îndepărtarea raportorilor în exces

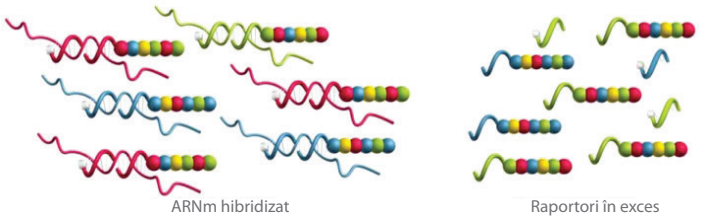


Figura 3: Legarea raportorilor hibridizați de suprafața cartușului

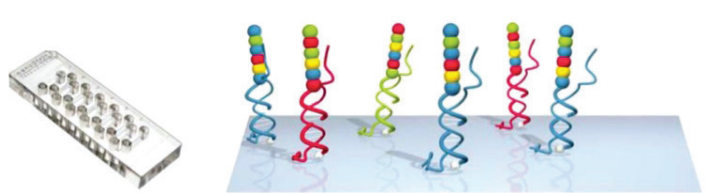
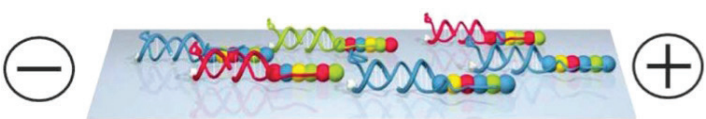


Figura 4: Alinierea și imobilizarea raportorilor hibridizați



După finalizarea procesării probei, cartușul este plasat în analizorul digital nCounter pentru colectarea datelor. Fiecare moleculă-țintă de interes este identificată prin „codul de culoare” generat de șase puncte fluorescente ordonate, prezente pe sonda raportor asociată. Sondele raportoare de pe suprafața cartușului sunt apoi numărate și tabelate pentru fiecare moleculă țintă și procesate cu ajutorul algoritmului (Figura 5).

Figura 5: Colectarea datelor

Cod	Genă	Număr
1	x	3
2	y	1
3	z	2

2.2 Principii ale algoritmului Prosigna pentru calculul valorilor rezultate

Testul se bazează pe algoritmul de clasificare a celor 50 de gene, denumit inițial PAM50² și este realizat pe sistemul de analiză nCounter folosind ARN-ul extras din probe de țesuturi tumorale mamare fixate în formol și încăstrate în parafină (FFPE). Algoritmul utilizează un profil de expresie a 50 de gene pentru a alocă cancerul mamar uneia dintre cele patru clase moleculare sau subtipuri intrinseci: Luminal A, Luminal B, HER2 îmbogățit sau bazal². Profilurile prototip de expresie genică (de exemplu, centroid) ale celor patru subtipuri intrinseci au fost reeducate pe sistemul de analiză nCounter folosind probe de tumori mamare FFPE colectate din mai multe centre clinice din America de Nord. După efectuarea testului pe o probă de test a unui pacient, un algoritm de calcul bazat pe o corelație Pearson compară profilul de expresie normalizat a 50 de gene al probei de test a pacientului cu profilurile de expresie prototip ale celor patru subtipuri intrinseci de cancer de sân. Subtipul cu cea mai mare corelație Pearson este atribuit probei de test a pacientului.

Algoritmul raportează, de asemenea, un scor al riscului de recidivă (ROR) pe o scară de 0-100³, care este corelat cu probabilitatea de recidivă la distanță la zece ani pentru femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân pozitive la receptori hormonal, în stadiu incipient⁴. Raportul oferă, de asemenea, o categorie de risc (scăzut, intermediar sau ridicat). Scorul ROR este calculat folosind coeficienții unui model Cox care include corelația Pearson a unui subset de 46 de gene din cele 50 de gene cu fiecare centroid de subtip intrinsec, un scor de proliferare și dimensiunea brută a tumorii. Variabilele de testare sunt înmulțite cu coeficienții corespunzători din modelul Cox pentru a genera scorul, care este apoi ajustat la o scară 0-100 pe baza coeficienților generați din setul de antrenament al probelor de tumori mamare FFPE. Categoriile de risc sunt, de asemenea, raportate pe baza valorilor limită pentru ROR determinate în cadrul unui studiu de validare clinică.

3 REACTIVI ȘI ECHIPAMENTE FURNIZATE

3.1 Prezentare generală a setului Prosigna

Setul Prosigna conține reactivi suficienți pentru a procesa 1, 2, 3, 4 sau 10 probe de pacienți, în funcție de produsul comandat. Consultați mai jos pentru informații privind comenzile. Setul Prosigna conține un CodeSet, o eprubetă pentru proba de referință pentru fiecare set de unul până la zece teste și componente consumabile, a căror performanță este testată împreună înainte de lansare.

Număr de catalog	Numărul de teste din kit	Eprubete de probă de referință incluse
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Se recomandă utilizarea împreună cu setul de izolare a ARN-ului Roche FFPET (Roche-FFPET-025) sau cu setul de extracție a ARN-ului Veracyte FFPE (550100). Ambele seturi de extracție ARN sunt disponibile numai prin intermediul Veracyte.

3.2 Conținutul setului Prosigna pentru un kit Prosigna de 1, 2, 3, 4 sau 10 teste

Număr de teste	1	2	3	4	10
Cutie Prosigna CodeSet					
Prosigna Reporter CodeSet	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl
Prosigna Capture ProbeSet	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl
Probă de referință pentru ARN Prosigna	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl
Autocolant coduri de bare CodeSet	1	1	1	1	1
Codul de configurare test	1	1	1	1	1
Cutie placă de pregătire Prosigna					
Plăci de pregătire	1	1	1	1	2
Cutie cartuş Prosigna					
Cartușe nCounter	1	1	1	1	1
Cutie pachet de pregătire Prosigna					
Recomandări pentru stația de preparare nCounter	1	1	1	1	1
Capac adeziv pentru cartuşul nCounter	2	2	2	2	2
Teci pentru vârful nCounter	2	2	2	2	2
Tampon de hibridizare nCounter	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl
Bandă cu eprubete canelată de 12 godeuri	4	4	4	4	4
Capace bandă cu eprubete canelată de 12 godeuri	4	4	4	4	4

Cuprins descriere

Prosigna CodeSet

Tampon Prosigna Reporter CodeSet
Tampon Prosigna Capture ProbeSet
Tampon probă de referință pentru ARN Prosigna
Autocolant coduri de bare CodeSet
Cod de configurare a testului

acizi nucleici cu coloranți fluorescenți
acizi nucleici
acizi nucleici
fișă cu autocolante
card cu autocolant

Prosigna Prep Plates

Plăci de pregătire

cu perle superparamagnetice, tampon, săruri,
oligonucleotide, bile de polistiren care conțin
coloranți fluorescenți

Cartușuri Prosigna

Cartuș(uri) nCounter

cartuș(uri) pentru probă

Prosigna Prep Pack

Tampon de hibridizare nCounter
Bandă cu eprubete canelată de 12 godeuri
Capace bandă cu eprubete canelată de 12 godeuri
Recomandări stație de pregătire nCounter

săruri
benzi din plastic
capace din plastic
2 rafturi cu 90 de vârfuri + 6 perforatoare
nCounter
pelicule adezive
suporturi pentru vârfuri cu 6 godeuri

Capac adeziv pentru cartuşul nCounter
Teci pentru vârfuri nCounter

4 AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII

1. Pentru utilizare ca diagnosticare *In Vitro*.
2. Acest test este conceput pentru a fi efectuat de operatori instruiți în tehnici de biologie moleculară extrem de complexe, în conformitate cu reglementările locale.
3. Nu amestecați componentele seturilor printre loturile Prosigna. Funcționalitatea poate fi asigurată numai pe loturile Prosigna așa cum sunt ele furnizate, deoarece acestea sunt verificate în această manieră în timpul fabricării.
4. Niciun reactiv rămas nu trebuie reutilizat în testul Prosigna.
5. Eliminați orice reacție cu timpi sau temperaturi de hibridizare compromise.
6. Este important să se mențină integritatea lanțului de custodie a probei (de la țesut la ARN și de la ARN la analiză) pentru a se asigura că ID-ul probei pacientului este asociat cu rezultatul corect al testului.
7. Nepăstrarea reactivilor în condițiile menționate pe etichetă ar putea afecta negativ performanța testului.
8. Purtați întotdeauna mănuși în timpul manipulării reactivilor și a probelor.
9. Evitați contaminarea cu RNase, care poate afecta negativ calitatea rezultatelor.
10. Toate probele biologice și consumabilele trebuie manipulate ca și cum ar exista potențialul de transmitere a agenților infecțioși și trebuie eliminate cu precauțiile corespunzătoare, în conformitate cu reglementările locale relevante.

11. Nu pipetați niciodată cu gura.
12. Evitați contactul reactivului cu ochii, pielea și membranele mucoase.
13. Utilizați cele mai bune practici de laborator moleculare pentru a preveni contaminarea încrucișată între probele de testare sau cu obiective de acid nucleic de concentrație ridicată (sintetice sau amplificate prin PCR), care pot afecta negativ calitatea rezultatelor.
14. Niveluri foarte scăzute de azidă de sodiu (< 0,1%) sunt conținute după procesare în plăcile de pregătire Prosigna și în cartușele nCounter, prin urmare, se recomandă utilizarea recipientelor de plastic (nu din metal) pentru eliminarea deșeurilor. Deși este extrem de puțin probabil în cazul Prosigna, se știe că acumularea azidei de sodiu pe metal poate crea un pericol de explozie.
15. Informații suplimentare specifice privind eliminarea instrumentului pot fi consultate în Manualul de utilizare al sistemului de analiză nCounter și în manualele de service pentru stația de preparare și analizor digital.
16. Informații privind fișa cu date de securitate a materialelor pentru Reporter CodeSet, Capture ProbeSet, tamponul de hibridizare și plăcile de preparare pot fi găsite pe www.prosigna.com.
17. Toate materialele periculoase trebuie eliminate în conformitate cu fișele de securitate, cu reglementările locale relevante și/sau cu procedurile instituției dvs. privind eliminarea deșeurilor periculoase.
18. Orice CodeSet neutilizat trebuie eliminat.
19. În cazul în care categoria de dimensiune a tumorii unui pacient este introdusă în software în mod incorect, scorul ROR și clasificarea riscului pot fi afectate în mod negativ (de exemplu, scorul ROR modificat și/sau clasificarea greșită).
20. În cazul în care statutul ganglionar al unui pacient este introdus în software în mod incorect, rezultatele testelor pacientului pot fi raportate incorect (de exemplu, clasificarea incorectă a riscului).
21. Nu utilizați ARN de calitate sau cantitate insuficientă sau probe de tumori cu o suprafață tumorală sau celularitate insuficientă în testul Prosigna. Este posibil ca testul Prosigna să nu poată oferi un rezultat valid și, în schimb, să raporteze un eșec al testului.

5 CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND ANALIZELE

1. Testul este destinat utilizării numai pe specimene de țesut de cancer mamar fixate în formol și încăstrate în parafină (FFPE), provenite din rezecția chirurgicală; acesta nu este destinat utilizării pe țesut proaspăt, congelat sau țesut fără cancer mamar.
2. Dimensiunea brută a tumorii primare a unui pacient și statutul ganglionar sunt necesare pentru a efectua testul.
3. Folosiți vârfuri de micropipete sterile de unică folosință pentru a evita contaminarea microbiană și cu nuclează a reactivilor sau a probelor în timpul procesării.
4. Păstrați probele de ARN izolate pe gheață umedă atunci când nu sunt manipulate în mod activ.
5. Pentru blocurile termice sunt necesare termometre calibrate.
6. Nu utilizați componentele setului în cazul în care acestea ajung la destinație deteriorate.
7. Se recomandă ca laboratoarele care utilizează Prosigna să elaboreze și să utilizeze controale clinice (de exemplu, pentru categoria de risc) pentru a asigura precizia rezultatelor în timp, în cadrul procedurilor standard de control al calității în laborator.

5.1 Prelucrarea țesuturilor

1. Dacă nu se îndepărtează în mod corespunzător țesutul învecinat care nu este tumoral/normal prin macrodisecție în timpul procesării țesutului, acest lucru ar putea duce la o subestimare a riscului datorită unui scor ROR mai mic raportat medicului.
2. Dacă nu se îndepărtează în mod corespunzător ADN-ul genomic uman în timpul izolării ARN-ului ar putea avea ca rezultat o rată de eșec mai mare din cauza semnalului mai scăzut al testului sau o supraestimare a riscului din cauza unui scor ROR mai mare raportat medicului.
3. Toate secțiunile de țesut necolorate trebuie montate pe lame de microscop încărcate pozitiv pentru a evita desprinderea în timpul prelucrării țesutului.
4. În cazul specimenelor care necesită mai multe lame, toate lamele trebuie procesate împreună.
5. Secțiunile de țesut montate pe lame se pot degrada dacă sunt păstrate mai mult de 9 luni într-un mediu uscat.
6. Înlocuiți soluția de lucru cu glicerol 3% în fiecare săptămână sau dacă soluția devine tulbure, pentru a evita contaminarea.
7. Schimbați conținutul primei spălări cu D-Limonen după procesarea a 4 seturi de lame, iar conținutul recipientului de colorare cu etanol (EtOH) și al doilea recipient de colorare cu D-Limonen după procesarea a 8 seturi de lame pentru a evita compromiterea calității țesuturilor.
8. Aveți grijă la conturarea zonei tumorale pe lamele necolorate și la îndepărtarea țesutului netumoral pentru a vă asigura că țesutul tumoral nu este deranjat.

- Manipulați obiectele ascuțite cu grijă în timpul macrodisecției.
- Folosiiți o lamă de ras nouă pentru fiecare probă de țesut procesată.
- 10% SDS precipită frecvent la temperatura camerei și trebuie încălzit la 37 °C până la dizolvarea precipitatelor.*
- Noile loturi/loturi de seturi de izolare a ARN-ului trebuie testate în raport cu specificațiile setului de izolare pentru a verifica noile loturi de seturi în vederea testării pacienților (a se vedea secțiunea 11.5 pentru detalii).

*10% SDS este necesar, dar nu este furnizat pentru setul de izolare a ARN-ului Roche FFPE.

5.2 Efectuarea testului Prosigna

- Asigurați-vă că dimensiunea de categorie a tumorii primare brute a pacientului este introdusă corect în programul informatic.
- Asigurați-vă că statutul ganglionar de categorie al pacientului este introdus corect în programul informatic.
- Verificați dacă blocul termic cu capac încălzit necesar pentru hibridizare satisface specificațiile și este calibrat în mod regulat.
- Utilizați numai acele consumabile care au fost furnizate împreună cu setul Prosigna. Acestea sunt concepute special pentru a funcționa cu stația de pregătire nCounter și analizorul digital nCounter.
- Dacă tamponul de hibridizare a fost depozitat la temperaturi scăzute și se observă un precipitat, încălziți tuburile la 37 °C până când sărurile se dizolvă.
- Nu introduceți componentele de testare în vortex pentru a le amesteca, deoarece astfel puteți deteriora reactivii. Amestecarea trebuie efectuată cu ajutorul unei pipete.
- Nu centrifugați Reporter CodeSet la o viteză mai mare de 3.000 x g timp de mai mult de 10 secunde. Nu utilizați opțiunea „puls” pentru a centrifuga. În acest caz, CodeSet se poate precipita.
- Mențineți reacțiile de hibridizare la 65 °C până când acestea sunt gata să fie transferate în stația de pregătire. Setarea blocului termic pentru a coborî până la 4 °C sau plasarea probelor pe gheață la sfârșitul hibridizării ar putea duce la hibridizare încrucișată, ceea ce poate compromite rezultatele testelor.
- Dacă nu se plasează banda cu eprubetele la 65 °C în decurs de 15 minute de la adăugarea Capture ProbeSet, ar putea rezulta o hibridizare încrucișată, ceea ce poate compromite rezultatele testelor.
- Lipsa de inițiere a procesării stației de pregătire în decurs de 15 minute de la îndepărtarea probelor de la temperatura de 65 °C ar putea duce la o hibridizare încrucișată, ceea ce poate compromite rezultatele testelor.
- Asigurați-vă că capacele eprubetelor din bandă sunt bine închise înainte de hibridizare în blocul termic pentru a preveni evaporarea, fapt care poate compromite rezultatele testelor.

6 INFORMAȚII PRIVIND FORMAREA PROFESIONISTĂ

Acest test este conceput pentru a fi efectuat de operatori profesioniști instruiți în tehnici de biologie moleculară extrem de complexe, în conformitate cu reglementările locale. Vă rugăm să contactați Veracyte pentru informații de instruire specifice pentru utilizarea testului Prosigna.

7 MANIPULAREA DEȘEURILOR

Consultați Manualul de utilizare al sistemului de analiză nCounter pentru detalii privind manipularea deșeurilor specifice reactivilor și instrumentelor utilizate în aplicațiile DIV.

Consultați instrucțiunile de utilizare ale setului de extracție a ARN-ului ales pentru manipularea deșeurilor și detalii specifice reactivilor de extracție a ARN-ului.

8 DEPOZITARE ȘI MANIPULARE (REACTIVI)

Data de expirare pentru toate componentele setului de testare este listată pe eticheta cu cod de bare furnizată împreună cu cutia CodeSet, precum și pe eticheta exterioară a cutiei pentru toate componentele Prosigna.

- Componentele cutiei Prosigna CodeSet (Prosigna Reporter CodeSet, Prosigna Capture ProbeSet și proba de referință pentru ARN Prosigna) trebuie depozitate la -80 °C sau la o temperatură mai mică.
- Cartușele nCounter trebuie să fie depozitate la o temperatură de -20 °C sau mai mică.
- Plăcile de pregătire nCounter trebuie depozitate la 4 °C (2-8 °C).
- Componentele pachetului de pregătire nCounter trebuie depozitate la temperatura camerei 15 °C-25 °C.

9 INSTRUMENTE NECESARE PENTRU PROSIGNA

- Sistemul de analiză nCounter (număr de catalog NCT-SYST-DX) (include ambele instrumente de mai jos)
 - Stația de pregătire nCounter 5s (număr de catalog NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - Analizor digital nCounter 5s (număr de catalog NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Consultați Manualul de utilizare a sistemului de analiză nCounter pentru informații suplimentare.

10 REACTIVI ȘI ECHIPAMENTE NECESARE, DAR CARE NU SUNT FURNIZATE

10.1 Materiale

- Setul de izolare FFPE ARN (a se vedea secțiunea 11.5 pentru cerințele setului de izolare dacă nu se utilizează setul de izolare a ARN-ului Roche FFPE sau setul de extracție a ARN-ului FFPE Veracyte achiziționat prin Veracyte).
- Hematoxilina și eozina (H&E)
- Lame de microscop din sticlă încărcate pozitiv
- Agent de limpezire D-Limonen (clasă histologică)
- Etanol 100% (absolut), de calitate ACS sau echivalent (nu mai puțin de 99,5%).
- Glicerol, calitate pentru biologie moleculară
- Apă fără nuclează, calitate pentru biologie moleculară^{1,2}
- 10% SDS, calitate pentru biologie moleculară¹
- 100% izopropanol²
- Tub conic 50 ml²
- Lame de ras (sau bisturie de unică folosință)
- Lame de unică folosință Microtom
- capac cu filet 0,5 ml¹ și eprubete de microcentrifugare antiaderente de 1,5 sau 1,7 ml, fără RNază
- Vărfuri pentru micropipetă fără RNază cu barieră pentru aerosoli

¹ Materiale necesare, dar care nu este furnizate pentru setul de izolare a ARN-ului Roche FFPE.

² Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate pentru extragerea ARN-ului cu ajutorul setului de extracție a ARN-ului Veracyte FFPE și enumerate, de asemenea, în Instrucțiunile de utilizare pentru setul Veracyte.

10.2 Echipament

- Microtom
- Baie de apă (40 °C)
- Încălzitor de lamă (45 °C)
- Suport de uscare pentru lamele de microscop
- Micropipete; 2 µl, 20 µl, 200 µl și 1000 µl
- Mini-centrifugă cu un rotor pentru banda cu eprubete de 0,2 ml și un rotor standard pentru eprubete de microcentrifugă de 1,5/2,0 ml
- Micro-centrifugă standard de lucru pe masă cu un rotor cu unghi fix care se corelează cu eprubetele de centrifugare de 1,5 ml
- Vase dreptunghiulare de sticlă pentru colorare cu capace (dimensiuni interioare aproximative de 91 x 71 x 60 mm); este necesară o cantitate de 3 bucăți.
- Raft pentru lame (conține până la zece lame de sticlă de 3" x 1" (75 x 25 mm))
- Bloc termic uscat, staționar*
- Vortex pentru masă de lucru pentru eprubete de microcentrifugă
- Cilindru gradat (dimensiune sugerată: 100-250 ml)
- Ac de disecție sau clește cu capac de sticlă (unghiular, fără zimți)
- Termometre calibrate (acoperă intervalul 55 °C - 80 °C)
- Spectrofotometru UV/Vis cu microvolum (a se vedea specificațiile de mai jos)
- Bloc termic cu capac încălzit (a se vedea specificațiile de mai jos)
- Centrifugă cu adaptor pentru microplăci (a se vedea specificațiile de mai jos)
- Vas Coplin

* Echipament necesar pentru extracția ARN-ului cu setul de izolare a ARN-ului Roche FFPE și setul de extracție a ARN-ului Veracyte FFPE.

10.3 Specificațiile echipamentului

Tabelul 1: Spectrofotometru UV/Vis cu spectru complet de microvolum pentru cuantificarea acizilor nucleici

Caracteristică de design	Specificații
Intervalul de volum al probei	1-2 µl
Lungimea traseului	1 mm
Gama de lungimi de undă	260-280 nm
Precizia sau eroarea lungimii de undă	± 1 nm
Rezoluția spectrală sau lățimea de bandă	Mai mică sau egală cu 4 nm
Precizia absorbanței sau eroare fotometrică aleatorie	0,003 (traseu de 1 mm)
Limita de detecție	5 ng/µl ARN
Concentrația maximă	≥1.000 ng/µl ARN

Tabelul 2: Spectrofotometru UV/Vis cu fotodiodă de microvolum pentru cuantificarea acizilor nucleici

Caracteristică de design	Specificații
Intervalul de volum al probei	1 - 2 µl
Lungimea traseului	0,5 mm
Gama de lungimi de undă	260 și 280 nm
Rezoluția spectrală	Mai mică sau egală cu 8 nm
Precizia absorbției	3% (la 1,05 Abs la 260 nm)
Limita de detecție	4 ng/µl ARN
Concentrația maximă	≥1.000 ng/µl ARN

Tabelul 3: Bloc termic cu capac încălzit pentru hibridizarea testelor

Caracteristică de design	Specificații
Designul blocului termic	- Trebuie să se coreleze cu banda cu eprubete canulată de 12 x 0,2 ml, cu profil normal, care sunt furnizate în cadrul pachetului de pregătire nCounter. - Blocurile termice concepute pentru eprubetele cu profil scăzut (LP) și cu profil înalt (HP) nu sunt compatibile (denumite și blocuri „rapide” pentru termociclare) - Blocurile termice concepute pentru alte tipuri de eprubete (de ex, eprubete de 0,1 ml, eprubete de 1,5 ml) nu sunt compatibile. - Trebuie să fie programabil pentru a menține o temperatură de 65 °C - Trebuie să mențină temperatura la ± 1 °C față de 65 °C
Designul capacului încălzit	- Sunt acceptate capacele fixe sau cu înălțime reglabilă - Capacul trebuie să fie programabil la 70 °C

Tabelul 4: Centrifugă cu suport de microplăci pentru a roti plăcile de pregătire nCounter

Caracteristică de design	Specificații
Viteza de centrifugare	Minim 2.000 x g
Rotoare	4 rotoare cu cupă oscilantă de 750 ml cu suporturi pentru microplăci (sau echivalent) pentru a găzdui microplăci cu 96 de godeuri în format SBS
Moduri	Moduri de accelerare/decelerare

11 RECOLTAREA ȘI PRELUCRAREA PROBELOR

11.1 Cerințe privind probele de țesut și examinarea patologică

- Testul Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature trebuie efectuat pe un specimen de țesut tumoral mamar pozitiv la receptori hormonalți fixat în formol și încastrat în parafină (FFPE), care va primi specificații ulterioare de la un medic anatomopatolog ca fiind unul dintre următoarele tipuri de carcinom mamar invaziv:
 - Carcinom ductal invaziv
 - Carcinom lobular invaziv
 - Carcinom invaziv cu caracteristici ductale și lobulare („carcinom de tip mixt”)
 - Fără un tip special (NST) sau nespecificat (NOS)
- Pentru acest test, medicul anatomopatolog trebuie să selecteze blocul tumoral FFPE cu cea mai mare suprafață de carcinom mamar invaziv viabil.
- Testul necesită secțiuni de țesut montate pe lame necolorate pentru procesare și o lamă colorată H&E corespunzătoare din blocul tumoral FFPE.
- Se recomandă ca secțiunile de țesut pentru procesarea testelor să fie tăiate în continuarea secțiunii de țesut tăiate pentru colorarea H&E pentru a se asigura că zona tumorală identificată pe lamele colorate cu H&E este reprezentativă pentru zona tumorală de pe lamele necolorate.
- Un medic anatomopatolog trebuie să încercuiască regiunea carcinomului mamar invaziv viabil pe lamele H&E, excluzând țesutul non-tumoral din jur.
- Un medic anatomopatolog sau un tehnician de laborator calificat trebuie să estimeze celularitatea tumorii și suprafața tumorii în zona încercuită de pe lama colorată cu H&E.
 - Procentul de celularitate a tumorii de pe lama colorată cu H&E trebuie să fie ≥10%.
 - Suprafața tumorală încercuită pe lama colorată cu H&E trebuie să fie ≥4 mm²

*Rețineți că procentul de celularitate tumorală se referă la procentul de celule tumorale viabile din zona tumorală încercuită.
- Se recomandă o suprafață tumorală totală mai mare de 100 mm² ca informații pentru test. Următorul tabel ilustrează numărul de lame recomandat în funcție de suprafața tumorală măsurată pe lama colorată cu H&E.
- În cazul în care procesul de examinare a țesutului arată că blocul de tumoare are o suprafață tumorală insuficientă sau o celularitate tumorală insuficientă, atunci poate fi evaluat un alt bloc din aceeași tumoare. În cazul în care nu există blocuri FFPE care să conțină suficient țesut tumoral, atunci testul Prosigna nu trebuie efectuat. Vă rugăm să rețineți că, în cazul tumorilor cu o suprafață mai mică de 20 mm², este mai probabil ca cerințele de informații ARN să nu fie satisfăcute.

Tabelul 5: Cerințe recomandate pentru lamele în funcție de suprafața tumorală

Suprafața tumorală măsurată pe lama colorată cu H&E (mm²)	Număr de lame necolorate
4–19	6
20–99	3
≥100	1

11.2 Recoltarea și depozitarea probelor

- Următoarele operațiuni pot fi efectuate în conformitate cu procedurile standard de operare ale laboratorului: recoltarea țesuturilor și fixarea în formol, manipularea și depozitarea blocurilor tumorale FFPE și transportul țesuturilor FFPE fixate pe lame.
- Secțiunile de țesut FFPE fixate pe lame trebuie depozitate în conformitate cu procedurile standard de operare ale laboratorului. În cazul în care se depozitează pentru perioade mai lungi de timp (>30 de zile), lamele trebuie păstrate într-un mediu uscat și prelucrate în termen de 9 luni pentru a asigura calitatea rezultatelor testului.

11.3 Pregătirea lamelor

- Cu ajutorul unui microtom, se taie o secțiune de 4-5 μm grosime pentru colorarea H&E.
- Cu ajutorul unui microtom, se taie secțiuni groase de 10 μm pentru a fi utilizate în testul Prosigna.
- Se lasă secțiunile să plutească într-o baie de apă la 40 °C.
- Fixați secțiunile pe lame de microscop din sticlă încărcate pozitiv.
- Lăsați lamele să se usuce la aer.
- Coaceți lamelele peste noapte la 45 °C.

11.4 Procesarea lamelor

- Se prepară o soluție de lucru de glicerol 3% amestecând 1,5 ml soluție mamă de glicerol cu 48,5 ml de apă de calitate moleculară, fără nucleaze; se măsoară după caz. Se toarnă soluția într-un vas Coplin pentru procesarea lamelor.
- Se toarnă aproximativ 200-250 ml de agent de limpezire D-Limonen în două vase de colorare, asigurându-se că lamele din suportul de lame vor fi complet scufundate.
- Se toarnă aproximativ 200-250 ml de etanol absolut (EtOH) într-un al treilea vas de colorare.
- Se plasează secțiunea (secțiunile) de țesut fixat(e) pe lame, necolorat(e), într-un suport pentru lame.
- Se plasează suportul de lame în primul vas de colorare cu D-Limonen și se agită ușor suportul de lame înainte și înapoi timp de 10-15 secunde. Se lasă raftul în primul vas de colorare cu D-Limonen timp de 2 minute.
- Mutați suportul de lame din primul vas de colorare cu D-Limonen în cel de-al doilea vas cu D-Limonen. Agitați ușor suportul de lame înainte și înapoi timp de 10-15 secunde. Lăsați raftul pentru lame în primul vas de colorare cu D-Limonen timp de 2 minute. Asigurați-vă că toată parafina a fost îndepărtată; în caz contrar, lăsați suportul în cel de-al doilea vas de colorare cu D-Limonen timp de încă aproximativ 1 minut.
- Mutați raftul de lame din primul vas de colorare cu D-Limonen în cel de-al doilea vas cu D-Limonen. Agitați ușor suportul de lame înainte și înapoi timp de 10-15 secunde și scoateți-l după 2 minute.
- Lăsați lamele să se usuce la aer timp de 5-10 minute sau până când se usucă complet, iar țesutul apare alb (acest lucru poate dura mai mult în funcție de dimensiunea țesutului).
- Conturați zona tumorală pe partea din spate a lamei (lamelor) necolorat(e) prin alinierea acesteia cu lamele colorate cu H&E corespunzătoare și prin transpunerea zonei conturate.
- Lucrând cu câte o lamă pe rând, rehidratați țesutul de pe lamele necolorate, prin scufundarea acestora în soluția de glicerol 3%.
- Îndepărtați excesul de glicerol de pe lamă cu un șervețel de laborator.
- Atunci când se procesează mai multe lame, utilizatorul poate lăsa lamele să se usuce pe un suport de uscare în timp ce rehidratează celelalte lame.
- Raclați cu o lamă de ras sau cu un bisturiu orice țesut care nu este tumoral din jurul zonei tumorale conturate și eliminați-l.
- Ținând un capăt al lamei și sprijinind celălalt capăt pe o suprafață solidă într-un unghi de 45 de grade, se colectează țesutul tumoral macrodisecționat pe marginea unei lame de ras. Țesutul trebuie să se „onduleze” ușor pe lama de ras în timp ce este colectat.
- Se repetă pasul anterior pentru fiecare lamă din același specimen.

Notă: Pe aceeași lamă de ras se pot colecta mai multe lame necolorate de la un singur specimen FFPE.

16. Glisați ușor secțiunile de țesut din același specimen într-o eprubetă de microcentrifugare de 1,5 ml etichetată.
17. În cazul în care este utilizat, curățați acul de disecție sau cleștele prin imersie în D-Limonen timp de câteva secunde și uscați între probele de țesut.

11.5 Izolarea ARN-ului

Veracyte recomandă utilizarea setului de izolare a ARN-ului Roche FFPET sau a setului de extracție a ARN-ului Veracyte FFPE, care au fost validate special pentru utilizarea cu Prosigna.

Alte seturi de izolare a ARN-ului pot fi utilizate pentru a pregăti probe pentru Prosigna, dacă acestea produc ARN din secțiuni de țesut de tumoare mamară FFPE fixate pe lame, care respectă următoarele specificații:

Tabelul 6: Specificațiile setului de izolare ARN

Date metrice	Test sau măsurare	Specificații
Concentrația de ARN	Densitate optică la 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ l
Volumul total de ARN (μ l)	Volumul total eluat	≥ 12 μ l
Puritate ARN	Raportul dintre densitatea optică la 260 nm și densitatea optică la 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7–2,3
Contaminare ADN	Conținutul de ADN genomic al probei de ARN eluate	≤ 1 ng/ μ l
Integritate ARN	Distribuția dimensională a fragmentelor de ARN izolate	$\geq 90\%$ din fragmentele de ARN izolate trebuie să aibă o lungime de >100 nucleotide.

Atenție: În cazul în care se utilizează o procedură alternativă de izolare în combinație cu testul Prosigna, acest flux de lucru trebuie să fie validat pe deplin de către laborator înainte de a fi implementat în mod curent.

Procedura de izolare a ARN-ului:

- Dacă se utilizează setul de izolare a ARN-ului Roche FFPET, urmați instrucțiunile specifice pentru izolarea ARN-ului descrise mai jos.
- În cazul în care se utilizează setul de extracție a ARN-ului Veracyte FFPE, urmați instrucțiunile de utilizare furnizate de Veracyte și apoi treceți la secțiunea 11.6.
- În cazul în care se utilizează o metodă de extracție alternativă, se urmează protocolul validat sau protocolul furnizat de producător, apoi se trece la punctul 11.6.

Fiecare lot de kit de extracție a ARN-ului fabricat de Roche sau de Veracyte este verificat pentru a produce probe de ARN care satisfac specificațiile predefinite pentru testele de diagnosticare a expresiei genice. Vă rugăm să consultați Fișa de metode / Instrucțiuni de utilizare a setului de extracție a ARN-ului ales pentru instrucțiuni adecvate de depozitare, siguranță și manipulare.

Pregătirea soluțiilor de lucru pentru setul de izolare a ARN-ului Roche FFPET

1. Pregătiți soluțiile de lucru înainte de a proceda la digerarea țesuturilor și la izolarea ARN-ului:

Pregătirea soluțiilor de lucru	
Reactiv	Procedură
Tampon de spălare I (WB1)*	Se adaugă 15 ml de etanol 100%, se păstrează WB1 preparat la o temperatură cuprinsă între +15 și +25 °C.
Tampon de spălare II (WB2)*	Se adaugă 80 ml de etanol 100%, se păstrează WBII preparat la o temperatură cuprinsă între +15 și +25 °C.
Proteinază K (PK)	Se dizolvă proteinaza K liofilizată în 4,5 ml de tampon pentru pregătirea reactivilor (RPB). Pregătiți alicote de 600 μ l, etichetați și păstrați alicotele la -15 până la -25 °C.
DNase I (DNase I)*	Se dizolvă proteinaza K liofilizată în 750 μ l de tampon pentru pregătirea reactivilor (RPB). Pregătiți alicote de 50 μ l, etichetați și depozitați alicotele la -15 până la -25 °C.

Notă: Elementele marcate cu un asterisc (*) nu sunt necesare decât după ce țesutul a fost digerat.

Digerarea țesuturilor pentru setul de izolare a ARN-ului Roche FFPET

1. Se decongelează un număr suficient de alicote de proteinază K (PK). Odată decongelate, se păstrează alicotele la gheață până la momentul utilizării.
Notă: O alicotă de 600 μ l PK conține suficientă proteinază K pentru 4 digerări de țesut.
2. Adăugați 100 μ l de tampon de liză tisulară (TLB), 16 μ l de 10% SDS și 120 μ l de soluție de lucru de proteinază K în eprubetele de probă cu țesut.
3. Centrifugați eprubetele de probă cu țesut timp de câteva secunde și reduceți viteza pentru scurt timp.
4. Se incubează la 55 °C peste noapte (12 ore - 23 ore).

Izolarea ARN-ului pentru setul de izolare a ARN-ului Roche FFPET

1. Inspectați vizual eprubetele de probă pentru a determina dacă țesutul este complet digerat. O digerare completă va avea un aspect limpede și va conține puțin sau deloc țesut în soluție.

- a. Dacă digerarea este completă, treceți la etapa următoare.
 - b. În cazul în care digerarea este incompletă, se adaugă 20 μ l de proteinază K în plus și se incubează încă o oră.
2. Centrifugați rapid pentru scurt timp toate probele (<30 de secunde într-o minicentrifugă).
 3. Se incubează probele la 80 °C timp de 15 minute.
 4. Se prepară sau se decongelează un număr suficient de alicote de DNază. Odată decongelate, se păstrează alicotele la gheață până la momentul utilizării.
Notă: O alicotă de 50 μ l de DNază conține suficientă DNază pentru 4 izolări de ARN.
 5. Se diluează DNaza în tamponul de incubare a DNazei (DIB). Cantitatea necesară pentru N (număr de) izolări de ARN este: $(N+1) \times 90$ μ l de tampon de incubare a DNază + $(N+1) \times 10$ μ l de DNază. Păstrați soluția de DNază diluată la gheață până la momentul utilizării.
 6. Adăugați 325 μ l de tampon de legare a parafinei (PBB) și 325 μ l de etanol absolut la fiecare probă și amestecați prin pipetare.
 7. Centrifugați rapid (<30 de secunde într-o minicentrifugă).
 8. Așezați o eprubetă de filtrare High Pure pe e eprubetă de colectare High Pure.
 9. Pipetați proba în rezervorul superior al eprubetei de filtrare, evitând orice țesut rezidual.
 10. Centrifugați timp de 30 de secunde la 6.000 $\times g$.
 11. Așezați eprubeta de filtrare High Pure pe o eprubetă de colectare High Pure nouă (eliminați eprubeta de colectare veche care conține flow-through).
 12. Centrifugați timp de 2 minute la 16.000 $\times g$ pentru a usca complet pânda de filtru.
 13. Așezați eprubeta de filtrare High Pure pe o eprubetă de colectare High Pure nouă (eliminați eprubeta de colectare veche care conține flow-through).
 14. Adăugați 100 μ l soluție de DNază diluată pe pânda de filtru a eprubetei de filtrare High Pure și incubați timp de 15 minute la +15 până la +25 °C.
 15. Adăugați 500 μ l soluție de lucru tampon pentru spălare I (WB1) la pânda de filtru High Pure, centrifugați timp de 20-30 de secunde la 6.000 $\times g$, eliminați flow-through.
 16. Adăugați 500 μ l soluție de lucru tampon pentru spălare II (WB2) la pânda de filtru High Pure, centrifugați timp de 20-30 de secunde la 6.000 $\times g$, eliminați flow-through.
 17. Adăugați 500 μ l soluție de lucru tampon pentru spălare II (WB2) la pânda de filtru High Pure, centrifugați timp de 20-30 de secunde la 6.000 $\times g$, eliminați flow-through.
 18. Centrifugați timp de 2 minute la 16.000 $\times g$ pentru a usca complet pânda de filtru.
 19. Introduceți eprubeta de filtrare de înaltă puritate într-o eprubetă de microcentrifugare de 1,5 sau 1,7 ml, fără RNază, etichetată.
 20. Adăugați 30 μ l tampon de eluție (EB) în centrul pânzei de filtru High Pure.
 21. Incubați timp de 1 minut la +15 până la +25 °C.
 22. Centrifugați timp de 1 minut la 6 000 $\times g$ pentru eluarea ARN-ului din coloană. Îndepărtați și eliminați eprubeta de filtrare High Pure.
 23. Centrifugați ARN-ul eluat în eprubeta de microcentrifugare timp de 2 minute la viteză maximă.
 24. Transferați supernatantul într-o eprubetă cu capac cu filet de 0,5 ml, fără a tulbura fibrele de sticlă care s-ar fi putut desprinde prin spălare de pe materialul de filtrare pe fundul eprubetei originale.

11.6 Măsurarea concentrației și a calității ARN-ului

1. Măsurati concentrația ARN-ului izolat în aceeași zi lucrătoare (păstrați la o temperatură cuprinsă între +2 și +8 °C) sau congelați la -70 °C sau mai puțin până la utilizare.
2. Măsurati densitatea optică (DO) la 260 și 280 nm a 2 μ l de ARN izolat cu ajutorul unui spectrofotometru care respectă specificațiile definite la punctul 10.3 Specificații privind echipamentul. Evitați să pipetați volumul de 2 μ l de pe fundul eprubetei sursă în cazul în care rămân fibre de sticlă, care vor interfera cu citirea densității optice.
3. Urmăriți instrucțiunile producătorului spectrofotometrului pentru măsurarea ARN-ului.
4. În cazul în care o probă nu îndeplinește parametrii minimi de puritate sau concentrație a ARN-ului (Tabelul 6), centrifugați eprubeta de probă timp de 1 minut la viteză maximă ($>10.000 \times g$), puneți eprubeta pe gheață și repetați procesul de măsurare. Dacă proba continuă să nu respecte parametrii de puritate sau de concentrație, proba de ARN nu este adecvată pentru analiză în cadrul procedurii de testare Prosigna. Nu utilizați ARN de calitate sau cantitate insuficientă în testul Prosigna.
5. Extracția ARN-ului se poate repeta dacă nu sunt îndeplinite specificațiile privind concentrația minimă sau puritatea minimă (Tabelul 6). Utilizatorii pot alege să izoleze lame suplimentare din același bloc FFPE sau să aleagă un bloc separat de la același pacient.

6. În cazul în care concentrația de ARN depășește 250 ng/μl, acesta trebuie diluat cu apă fără RNază și DNază de calitate moleculară până la o concentrație țintă de 200 ng/μl înainte de a efectua testul de hibridizare ulterior. Utilizați rezultatul înregistrat al raportului DO 260/280 din proba nediluată pentru a determina dacă proba diluată respectă puritatea minimă a ARN-ului de 1,7.
7. Congelați ARN-ul la -70 °C sau la o temperatură mai mică dacă testul Prosigna nu poate fi finalizat în aceeași zi lucrătoare.

11.7 Procedura de testare

Această procedură de analiză descrie pașii necesari pentru efectuarea testului Prosigna utilizând sistemul de analiză nCounter. Aceste etape pot fi rezumate în următoarele categorii în două zile consecutive:

Prima zi

- Configurarea înregistrării de identificare a setului de execuție (RSID) în aplicația web
- Configurarea hibridizării ARN cu Prosigna CodeSet (30 minute de configurare, 15-21 ore de hibridizare)

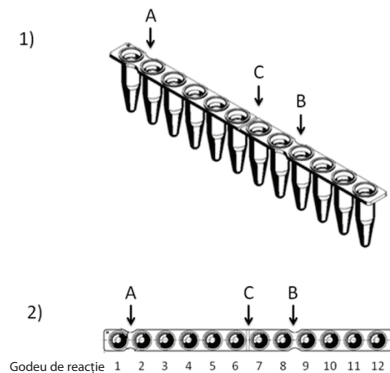
Ziua a doua

- Configurarea și punerea în funcțiune a stației de preparare (20 de minute de configurare, 2-3 ore pe cursă, în funcție de numărul de probe analizate).
- Configurarea și scanarea cartușului pe analizorul digital (5 minute pentru configurare, 2,5-4,5 ore pentru fiecare cartuș, în funcție de numărul de probe analizate).
- Recuperarea raportului (30 de minute)

Selectarea probelor de la pacienți și configurarea lotului

1. Determinați probele de pacienți care vor face parte din testul rulat. Într-un singur lot pot fi incluse până la 10 probe
 - a. Fiecare probă din cadrul lotului va fi alocată unei poziții unice în cadrul unei eprubete cu bandă de 12 godeuri folosită pentru hibridizare, care este înregistrată în cadrul ID-ului setului de teste pe instrument (ID-ul setului de teste se realizează prin intermediul aplicației software web). Rețineți că pozițiile 1 și 2 sunt rezervate pentru proba de referință, iar pozițiile 3-12 sunt pentru probele de ARN tumoral.
 - b. Ilustrația de mai jos prezintă o vedere laterală 1) și o vedere de sus 2) ale benzii cu eprubete. Banda cu eprubete este fixată asimetric între godeurile de reacție 1 și 2 (A) și 8 și 9 (B) pentru a ajuta la menținerea ordinii probelor în timpul procesării. De asemenea, eprubetele din bandă sunt canelate între godeurile de reacție 6 și 7 (C) pentru a facilita tăierea eprubetei din bandă, dacă este cazul, pentru a se corela cu adaptoarele de centrifugare standard.

Figura 6: Ilustrație a eprubetelor în bandă canelate



2. Calculați cantitatea de ARN și de apă (dacă este cazul) care trebuie adăugată la reacția de hibridizare pentru fiecare probă din lot.
 - a. Cantitatea de ARN recomandată pentru acest test este de 250 ng. Intervalul acceptabil de cantitatea de ARN pentru hibridizare este 125-500 ng.
 - b. Calculați volumul (în microlitri) de probă de ARN care trebuie adăugat la reacția de hibridizare prin împărțirea cantității de probă de introdus dorită (de exemplu, 250 ng) la concentrația măsurată.
 - c. În cazul în care concentrația calculată a probei este cuprinsă între 12,5 ng/μl și 25 ng/μl, se adaugă volumul maxim de 10 μl.

- d. Pentru probele care necesită mai puțin de 10 μl, calculați volumul de apă necesar pentru a genera 10 μl de volum total al probei.

Exemplu: Pentru o probă cu o concentrație de ARN măsurată de 85 ng/μl, este nevoie de 2,9 μl de probă pentru o masă totală de 250 ng și de 7,1 μl de apă pentru a aduce volumul la 10 μl înainte de a adăuga restul reactivilor. În ecuație: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Înregistrarea și procesarea probelor

Utilizatorul va crea un ID unic al setului de probe (Run Set ID) pentru fiecare lot de probe, asociind ID-urile probelor cu locația eprubetei în bandă (pozițiile 3-12) cu ajutorul aplicației web nCounter Analysis System Services. Utilizatorul poate consulta Manualul utilizatorului pentru instrucțiuni privind utilizarea aplicației web nCounter Analysis System Services.

1. Dacă ARN-ul a fost congelat înainte de utilizare, efectuați următorii pași înainte de a continua:
 - a. Decongealați complet probele de ARN și păstrați-le la gheață.
 - b. Centrifugați eprubeta de probă decongelată timp de 1 minut la viteză maximă ($>10.000 \times g$) și puneți-o din nou la gheață.
 2. Alegeți dimensiunea corespunzătoare a setului de testare Prosigna în funcție de numărul de probe de pacienți care se testează (1, 2, 3, 4 sau 10). Scoateți o eprubetă cu unul dintre fiecare dintre următorii reactivi din setul CodeSet din congelator la -80 °C în vederea decongelării. Păstrați reactivii la gheață dacă nu treceți imediat la etapele următoare.
 - a. Prosigna Reporter CodeSet (autocolant verde pe capac)
 - b. Prosigna Capture ProbeSet (autocolant gri pe capac)
 - c. Probă de referință Prosigna (niciun autocolant pe capac)
 3. Îndepărtați autocolantul cu codul de bare al lotului CodeSet și un cod de configurare de testare din cutia CodeSet.
 4. Utilizând un browser web, conectați-vă la aplicația web IVD nCounter Analysis System și selectați Prosigna ca tip de test pentru a începe să configurați formularele de înregistrare digitală.
 5. Pe pagina principală, selectați „Create New Run Set” (Creare set nou).
 6. Primul câmp necesar pentru definirea unei serii Prosigna este ID-ul setului. Introduceți un identificator unic în câmpul Run Set ID pentru a identifica lotul de probe.
 7. Scanați sau introduceți manual codul de configurare a testului în aplicația web. După ce este scanat sau introdus, acesta poate fi eliminat.
 8. Scanați sau introduceți manual numărul setului CodeSet în aplicația web.
 9. În continuare, introduceți în câmpul ID unic de probă pentru proba care va fi localizată în a treia poziție/al treilea godeu al eprubetei din bandă în câmpul ID probă corespunzător.
 - a. Introduceți ID-urile probelor de ARN ale pacienților folosind un cititor de coduri de bare sau introducând manual ID-urile probelor folosind o tastatură.
 - b. După introducerea fiecărui ID de probă, derulați fila pentru a completa câmpurile derulante necesare (dimensiunea brută a tumorii și statutul ganglionar) pentru probă înainte de a introduce următoarea probă.
 - i. Utilizați numărul de ganglioni pozitivi stabilit în timpul evaluării patologice a pacientului pentru a selecta categoria ganglionară adecvată pentru test (zero, 1-3, ≥ 4).
 - ii. Folosiți dimensiunea brută a tumorii măsurate sau stadiul stabilit în timpul evaluării patologice a pacientului pentru a selecta categoria de dimensiune brută a tumorii corespunzătoare pentru test ($\leq 2 \text{ cm}$ sau $> 2 \text{ cm}$).
 - c. Orice comentariu poate fi introdus în câmpul opțional Memo pentru fiecare eșantion.
- Notă:** În cazul în care nu sunt necesare godeurile/posițiile eprubetei din bandă, lăsați câmpurile rămase libere. Dacă sunt necesare câmpuri suplimentare pentru mai multe probe, utilizați o altă configurație de testare care să permită mai multe probe.
10. După ce ați completat introducerea probei, specificați ce utilizatori primesc următoarele:
 - a. Actualizări de stare pentru stația de pregătire și rulările analizorului digital.
 - b. Notificarea că raportul final este disponibil.
 11. Salvați setul de probe finalizat.
 - a. Fișa de lucru a setului de probe poate fi tipărită și utilizată în scopul trasabilității și al verificării probelor.

Procedura reacției de hibridizare

Notă: Următoarele etape presupun zece (10) probe de pacient și două (2) probe de referință.

Notă: Nu centrifugați Reporter CodeSet mai repede de $3.000 \times g$ sau mai mult de 10 secunde și nu-l „pulsați” pentru a-l centrifuga. În acest caz, centrifuga va atinge viteza maximă și poate scoate prin centrifugare CodeSet din soluție.

1. Programați blocul termic folosind volumul de 30 μ l, temperatura calculată a blocului și a capacului și setare de timp „pentru totdeauna” (sau o setare echivalentă a timpului de menținere). Setări temperatura blocului termic la 65 °C și setați capacul încălzit la 70 °C.

Notă: Pentru etapele următoare, este esențial să se respecte ordinea în care probele sunt adăugate în banda cu eprubete, asigurându-vă că acestea corespund ordinii de pe ID-ul setului de probe.

2. Etichetați tubul cu 12 godeuri, prevăzut cu caneluri, pentru a distinge pozițiile 1-6 de pozițiile 7-12 (a se vedea ilustrația eprubetei).
3. Dacă este necesar, tăiați banda cu eprubete în două, astfel încât să intre într-o minicentrifugă cu un adaptor pentru banda cu eprubete.
4. Se pipetează 10 μ l de probă de referință în pozițiile 1 și 2 ale benzii cu eprubete canelate.
5. Pipetați volumul calculat de apă necesar pentru fiecare probă în pozițiile respective din banda cu eprubete canelate.
6. Pipetați volumul de ARN calculat necesar pentru fiecare probă în poziția respectivă din banda cu eprubete canelată, folosind un vârf nou de pipetă pentru fiecare probă.
7. După ce proba pacientului a fost adăugată în eprubeta din bandă, se recomandă să plasați eprubeta cu probă într-un suport pentru eprubete cu probă, păstrând ordinea în care proba a fost adăugată în banda cu eprubete. Aceasta este pentru a verifica dacă probele au fost adăugate în ordinea prevăzută, după ce toate probele sunt adăugate în banda cu eprubete.
8. După ce toate probele au fost adăugate în banda cu eprubete, verificați dacă ordinea probelor a fost menținută în banda cu eprubete (pentru verificarea ordinii probelor se poate utiliza fișa de lucru pentru setul de probe).

- a. Dacă este necesar, editați ID-ul setului de execuție cu ajutorul aplicației software Web pentru a reflecta ordinea probelor în dispunerea finală (consultați Manualul de utilizare al sistemului de analiză nCounter pentru instrucțiuni privind editarea unui ID de set de probe existent).

9. După ce s-a verificat ordinea probelor, puneți eprubetele individuale cu probe de ARN înapoi la gheață.
10. Creați un amestec principal care conține 130 μ l de tampon de hibridizare și 65 μ l de Reporter CodeSet.

Notă: Dacă Reporter CodeSet a fost depozitat la gheață, lăsați-l să se echilibreze la temperatura camerei timp de 1 minut înainte de a adăuga tamponul de hibridizare.

11. Amestecați prin pipetare și centrifugați rapid pentru scurt timp amestecul principal.

Notă: Nu adăugați amestecul original la gheață.

12. Pipetați 15 μ l de amestec principal în fiecare dintre cele 12 godeuri. Folosiți un vârf de pipetă nou pentru fiecare godeu.

Notă: După finalizarea etapei următoare, banda cu eprubete trebuie să fie plasată în blocul termic la 65 °C în decurs de 15 minute.

13. Adăugați 5 μ l de Capture ProbeSet în fiecare godeu, folosind un vârf de pipetă nou pentru fiecare godeu.

14. Astupați godeurile eprubetelor din bandă și amestecați reactivii prin răsturnarea bandei cu eprubete de mai multe ori și lovind cu degetul pentru a asigura amestecarea completă.

15. Centrifugați rapid pentru scurt timp probele din banda cu eprubete într-o microcentrifugă Picofuge sau minicentrifugă (la $<3.000 \times g$).

Notă: Folosiți o microcentrifugă Picofuge care poate găzdui o bandă de eprubete cu 12 godeuri sau, dacă este cazul, o minicentrifugă care poate găzdui eprubete tăiate din bandă.

16. Plasați banda(ele) cu eprubete într-un bloc termic la 65 °C cu un capac încălzit. Incubați testele de hibridizare la 65 °C timp de 15-21 de ore. Hibridizările trebuie lăsate la 65 °C până când sunt pregătite pentru procesare pe stația de preparare.

Notă: Eliminați orice CodeSet neutilizat.

Procesarea probelor pe stația de pregătire nCounter

1. Localizați stația de pregătire asociată cu analizorul digital.
2. Scoateți cartușul nCounter de la depozitarea la -20 °C și lăsați-l să se echilibreze la temperatura camerei timp de 10-15 minute în punga de aluminiu.

Notă: Asigurați-vă că utilizați împreună componente din același lot de seturi.

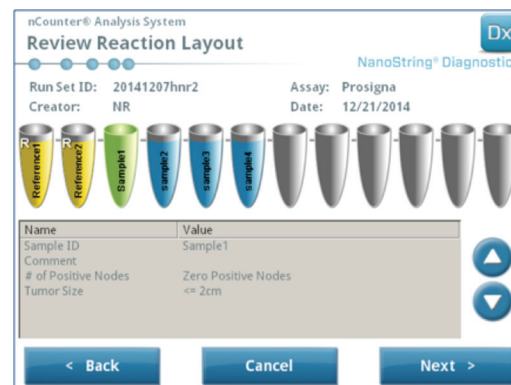
3. Când cartușul a ajuns la temperatura camerei, scoateți-l din punga de aluminiu înainte de a-l încălca pe puntea stației de pregătire.

4. Eliminați placa de pregătire nCounter de la depozitare la 4 °C și lăsați-o să se echilibreze la temperatura camerei timp de 10-15 minute.

Notă: Este necesară doar o singură placă de pregătire pentru testele efectuate cu ajutorul unui kit Prosigna cu 1, 2, 3 sau 4 teste.

5. Centrifugați placă de pregătire la $2.000 \times g$ timp de 2 minute pentru a colecta lichidele de pe fundul godeurilor înainte de a încălca plăcile de pregătire pe puntea stației de pregătire.
6. În timp ce cartușele și placa (plăcile) de pregătire ajung la temperatura camerei, pregătiți stația de pregătire cu consumabilele nCounter Prep Pack.
7. Cu ajutorul interfeței cu ecran tactil a stației de pregătire nCounter, selectați butonul „Diagnostics” (Diagnosticare) pentru testul dvs..
8. În ecranul Main Menu (Meniu principal), selectați butonul „Process Samples” (Procesare probe) de pe interfața cu ecran tactil.
9. Explorați lista de ID-uri pentru setul de probe (RSID) disponibile, afișată pe ecran, pentru a confirma RSID-ul pentru probele aflate în curs de procesare.
10. Selectați RSID prin atingerea ecranului și selectând „Next” (Următorul) pe interfața cu ecran tactil.
11. Pe interfața cu ecran tactil, verificați dacă a fost selectat RSID-ul corespunzător, examinând fiecare eprubetă de pe ecran și comparând informațiile despre probă.
 - a. Fișa de lucru a setului de probe poate fi utilizată în scopul trasabilității și al verificării probelor.
 - b. Dacă s-a selectat un RSID incorect, atingeți butonul „Back” (Înapoi) și selectați RSID-ul corect.
 - c. Dacă RSID era corect, dar există erori de informații ale probei, atingeți butonul „Back” (Înapoi) și mergeți la o stație de lucru pe calculator pentru a edita RSID prin intermediul aplicației web.

Figura 7: Ecran Procesarea unei probe pe stația de pregătire



12. În următoarele câteva ecrane vi se va solicita să scanați codurile de bare ale reactivilor solicitați în câmpurile deschise sau să confirmați plasarea pe puntea consumabilelor necesare. După efectuarea fiecărei sarcini, selectați „Next” (Următorul) pe interfața cu ecran tactil pentru a trece la următoarea solicitare.

Notă: Este necesară doar o singură placă de pregătire și o singură bandă de eprubete goală pentru încălzitor pentru testele efectuate cu ajutorul unui kit Prosigna cu 1, 2, 3 sau 4 teste. Pentru serii de seturi de 1, 2, 3 sau 4 teste, încălcați placa de pregătire și banda cu eprubete goală de încălzire în pozițiile lor frontale respective (cel mai apropiat de utilizator) pe puntea stației de pregătire.

13. Se îndepărtează probele din blocul termic.

Notă: Inițiați rularea stației de pregătire în termen de 15 minute de la scoaterea probelor din blocul termic.

14. Amplasați banda cu eprubete într-o microcentrifugă Picofuge sau minicentrifugă (la $<3.000 \times g$).

15. Îndepărtați cu grijă capacele eprubetelor de pe banda cu eprubete.

16. Canelurile de pe banda cu eprubete și ghidajele de pe stația de pregătire trebuie să mențină ordinea și orientarea corectă a probelor.

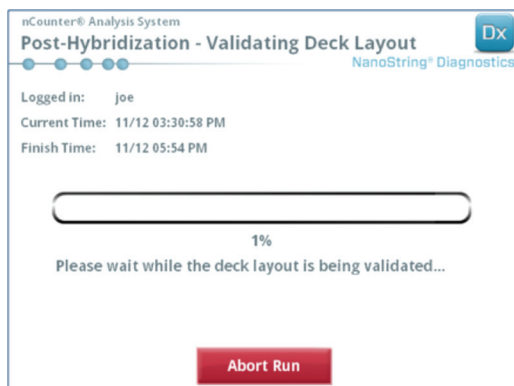
17. Așezați banda cu eprubete cu godeurile în ordinea 1-12 de la stânga la dreapta pe puntea stației de pregătire nCounter. În cazul în care se efectuează o analiză utilizând un kit de 1, 2, 3 sau 4 teste, trebuie să se plaseze doar prima jumătate a benzii cu eprubete (godeurile 1-6) în partea stângă a suportului pentru eprubetele de probă de pe platformă, dacă este cazul. Vă rugăm să rețineți că este important să folosiți numai godeurile 1-6; a doua jumătate a benzii cu eprubete (godeurile 7-12) nu se va corela în jumătatea stângă a suportului din cauza designului canelat al eprubetei.

18. Confirmați că eprubetele benzii sunt așezate ferm pe stația de pregătire și închideți capacul metalic.

19. În cazul în care capacul nu se închide corect, vi se va solicita să îl închideți în timpul validării disponibilității de punte.

20. Selectați „Next” (Următorul) pe interfața cu ecran tactil.
21. Închideți ușa instrumentului atunci când vi se solicită acest lucru și selectați „Next” (Următorul) pentru a începe validarea disponibilității punții.
22. Dacă apare o eroare, urmați instrucțiunile asociate cu eroarea specifică pentru a continua validarea disponibilității de pe punte.

Figura 8: Stație de pregătire a validării disponibilității punții posthibridizare



23. După ce disponibilitatea punții a fost validată, selectați „Start Processing” (Inițiere procesare) pe interfața cu ecran tactil.
Notă: Dacă întâmpinați probleme la pornirea stației de pregătire, readuceți probele hibridizate în blocul termic, dar nu depășiți timpul maxim de 21 de ore.
24. Urmăriți indicațiile de pe stația de pregătire după finalizarea unei rulări.
25. După ce stația de pregătire a finalizat rularea, scoateți cu grijă cartușul din stația de pregătire și sigilați godeurile cartușului cu capacul adeziv pentru godeurile cartușului furnizat.
Notă: Nu lăsați cartușul nesigilat pe stația de pregătire peste noapte.
26. Dacă nu veți scana probele în aceeași zi, păstrați cartușul la 4 °C într-o cutie opacă timp de până la 1 săptămână.

Cartușul de scanare pe analizorul digital nCounter

1. Localizați analizorul digital care este conectat la stația de pregătire care a procesat probele. Încărcați cartușul de scanare pe analizorul digital nCounter
 - a. Deschideți ușa de la analizorul digital.
 - b. Așezați cartușul care urmează să fie adăugat într-un slot gol.
 - c. Închideți ușa și consultați afișajul ecranului tactil.
2. Interfața cu ecran tactil a analizorului digital are mai multe grafice diferite pentru a ajuta la identificarea rapidă a stării pozitionale:
 - a. Locație goală: Acest slot este gol și este pregătit pentru a fi încărcat cu un cartuș nou.
 - b. Cartuș albastru complet: Scanare finalizată.

NU SCOATEȚI URMĂTOARELE CARTUȘE:

 - a. Cartuș alb: Acest slot conține un cartuș înregistrat, dar nescanat.
 - b. Cartuș albastru parțial: Acest slot conține un cartuș care este în curs de scanare.
3. Cartușele pentru care s-a finalizat scanarea pot fi scoase din analizorul digital.
4. Dacă acesta este primul cartuș încărcat pe analizorul digital, atingeți butonul „Diagnostics” (Diagnosticare), apoi selectați „Main Menu” (Meniu principal) pentru a vă autentifica pe analizorul digital. Dacă analizorul digital scanează deja cartușele, treceți la pasul 9 de mai jos.
5. Așezați cu grijă cartușul într-un slot liber (a se vedea ghidul de poziționare de mai sus) de pe analizorul digital. Slotul și cartușul sunt prevăzute cu caneluri pentru a asigura orientarea corectă. Codul de bare va fi orientat în sus.
6. Coborâți capacul fantei și apăsați cartușul prin deschiderea din capacul fantei pentru a vă asigura că acesta este așezat corect.
7. Atingeți butonul „Start Counting” (Inițiere numărare) și așteptați ca scannerul să înceapă procesul de scanare. Veți auzi o serie de mici clicuri ritmice pe măsură ce analizorul digital începe să scaneze cartușul.
8. Confirmați că pe ecran apare o bară albastră în poziția Cartridge (în DECURS de cinci minute de la începerea scanării), indicând că scanarea a început.
9. Pentru a adăuga un cartuș la un analizor digital care scanează deja cartușe, atingeți „Pause” (Pauză) pe ecranul „Counting Cartridges” (Numărare cartușe) și așteptați ca analizorul digital să întrerupă scanarea curentă.

10. Deschideți ușa de la analizorul digital.
11. Așezați cartușul care urmează să fie adăugat într-un slot gol (a se vedea ghidul stării pozitionale de mai sus).
12. Închideți ușa și atingeți „Resume” (Reluare).
13. Când scanarea este finalizată, software-ul va trimite raportul la adresele de e-mail ale utilizatorilor specificate anterior.
14. La primirea notificării prin e-mail, scoateți cartușul finalizat și eliminați-l în conformitate cu instrucțiunile instituției dvs.
Notă: Se vor genera rapoarte pentru rulările finalizate cu succes, precum și pentru rulările cu erori asociate cu controlul calității (QC) datelor. Rapoartele nu vor fi generate în cazul unei erori care nu este asociată cu controlul calității datelor. Contactați Serviciul Clienți Veracyte pentru asistență în acest caz.
15. Folosind linkul atașat la e-mailul respectiv, deschideți aplicația web și descărcați toate rapoartele de testare asociate cu RSID-ul în curs de procesare.
16. Urmărirea erorilor: Urmăriți recomandarea descrisă în raportul de testare pentru proba individuală sau pentru eroarea sistemului.
Notă: Eșecurile individuale ale probelor nu sunt considerate erori de sistem.

12 DEPANARE ȘI EȘECURI DE TESTARE

Tabelul 7: Coduri de eroare pentru repetarea testului

Cod de eroare	Descrierea eșecului	Acțiune recomandată
5	Eșec la scanare	Reulați proba cu 250 ng de ARN
7	Semnal înalt	Reobțineți specificațiile probei și reluați testul cu 125 ng de ARN
6	Semnal scăzut	Reobțineți specificațiile probei și reluați testul cu 500 ng de ARN
30	Semnal scăzut	Reobțineți specificațiile probei și reluați testul cu 500 ng de ARN
31	Semnal ARN scăzut	Reobțineți specificațiile probei și reluați testul cu 500 ng de ARN

Motive pentru repetarea testului:

1. Raportul de analiză va identifica probele eșuate și nu se va raporta niciun rezultat de analiză. În cazul probelor reușite, se raportează rezultatele testului.
2. Raportul de analiză va identifica tipul de eșec și acțiunile recomandate în cazul unui eșec al analizei. Concentrația de ARN din probele care nu au reușit să fie măsurate din nou, iar probele pot fi reanalizate (în cadrul unui nou lot/RSID), în funcție de tipul de eșec și de cantitatea de masă de ARN care rămâne pentru a obține un rezultat al analizei.

13 REZULTATELE TESTULUI

Testul Prosigna include o serie de măsurători de control al calității care sunt aplicate automat fiecărei probe în timpul analizei. Aceste măsurători evaluează performanța testului pentru a determina dacă rezultatele se încadrează în valorile estimate. În urma analizei cu succes a acestor parametri de control al calității, testul Prosigna oferă următoarele rezultate:

Tabelul 8: Rezultatele și valorile testului Prosigna

Rezultat	Valori obținute
Subtipul intrinsec al probei de cancer mamar	Luminal A Luminal B HER2-îmbogățit Bazal
Estimarea individuală a probabilității de recidivă la distanță în 10 ani	0–100%
Scorul riscului de recidivă (ROR)	Valoare întreagă pe o scară de 0-100
Categoria de risc	Scăzut, Intermediar, Ridicat

13.1 Subtipuri intrinseci

S-a demonstrat că subtipul intrinsec al unei tumori de cancer mamar este legat de prognosticul în cazul cancerului mamar în stadiu incipient. În medie, pacienții cu o tumoare Luminal A au rezultate semnificativ mai bune decât pacienții cu tumori Luminal B, HER2 îmbogățite sau tumori de tip bazal²⁵.

Subtipul intrinsec este identificat prin compararea profilului de expresie genetică a 50 de gene dintr-o probă necunoscută cu profilurile de expresie așteptate pentru cele patru subtipuri intrinseci. Subtipul cu profilul cel mai asemănător este atribuit probei necunoscute.

Cele mai frecvente subtipuri de cancer de sân sunt subtipurile luminale, Luminal A (LumA) și Luminal B (LumB). Studiile anterioare sugerează că Luminal A înglobează aproximativ 30% până la 40% și Luminal B aproximativ 20% din cancerele mamare⁵. Cu toate acestea, mai mult de 90% dintre pacienții pozitivi la receptorii hormonalni au tumori luminale. Modelul de expresie genetică al acestor subtipuri seamănă cu componenta epitelială luminală a țesutului mamar⁵. Aceste tumori se caracterizează printr-o expresie ridicată a receptorului de estrogen (ER), a receptorului de progesteron (PR) și a genelor asociate cu activarea ER, cum ar fi LIV1, GATA3 și ciclina D1, precum și prin expresia citokeratinelor luminale 8 și 18. Cancerle mamare Luminal A prezintă o expresie mai scăzută a genelor asociate cu activarea ciclului celular în comparație cu cancerle mamare Luminal B, ceea ce duce la un prognostic mai bun.

Studiile anterioare sugerează că subtipul HER2 îmbogățit cu HER2 (HER2-E) cuprinde aproximativ 20% din cancerele mamare⁵. Cu toate acestea, tumorile HER2 îmbogățite sunt în general ER-negative, astfel încât doar 5% din populația de pacienți cu ER-pozitivă a fost stabilită ca având cancer de sân HER2 îmbogățit. Indiferent de statusul ER, tumorile HER2 îmbogățite sunt HER2-pozitive în majoritatea cazurilor, cu o expresie ridicată a clusterului ERBB2, inclusiv ERBB2 și GRB7. Genele asociate cu activarea ciclului celular sunt, de asemenea, foarte bine exprimate.

Datele publicate sugerează că subtipul bazal cuprinde aproximativ 20% din cancerele mamare⁵. Cu toate acestea, tumorile de tip Bazal sunt, în general, ER-negative, astfel încât doar 1% dintre pacienții pozitivi la receptorii hormonalni au cancer de sân de tip Bazal. Subtipul de tip bazal este aproape întotdeauna clinic HER2-negativ și exprimă o suită de biomarkeri „bazali”, inclusiv citokeratinele epiteliale bazale (CK) și receptorul factorului de creștere epidermică (EGFR). Genele asociate cu activarea ciclului celular sunt, de asemenea, foarte bine exprimate.

13.2 Scorul ROR

Scorul ROR este o valoare întreagă pe o scală de 0-100 care este legată de probabilitatea unui pacient individual de recidivă la distanță în termen de 10 ani pentru populația de utilizare prevăzută definită. Scorul ROR este calculat prin compararea profilului de expresie a 46 de gene dintr-o probă necunoscută cu profilurile așteptate pentru cele patru subtipuri intrinseci, așa cum s-a descris mai sus, pentru a calcula patru valori diferite de corelație. Aceste valori de corelație sunt apoi combinate cu un scor de proliferare și cu dimensiunea brută a tumorii pentru a calcula scorul ROR.

13.3 Probabilitatea de recidivă la distanță de 10 ani

Scorurile ROR pentru 2 cohorte de femei aflate în postmenopauză cu cancer de sân cu receptori hormonalni pozitivi în stadiu incipient au fost comparate cu supraviețuirea fără recidivă la distanță după intervenția chirurgicală și tratamentul cu 5 ani de terapie endocrină adjuvantă urmată de 5 ani de observație (pentru detalii, a se vedea secțiunea 16.4 Performanță clinică). Aceste două studii au avut ca rezultat un model care corelează scorul ROR cu probabilitatea de recidivă la distanță în această populație de pacienți testată, incluzând un interval de încredere de 95%.

13.4 Clasificarea riscurilor

Clasificarea riscurilor este, de asemenea, furnizată pentru a permite interpretarea scorului ROR prin utilizarea unor valori limită legate de rezultatul clinic în populațiile de pacienți testate.

Tabelul 9: Clasificarea riscului în funcție de intervalul ROR și de statutul ganglionar

Statutul ganglionar	Interval ROR	Clasificarea riscurilor
Ganglioni-negativi	0–40	Scăzut
	41–60	Intermediar
	61–100	Crescut
Ganglion-pozitiv (1-3 ganglioni)	0–15	Scăzut
	16–40	Intermediar
	41–100	Crescut
Ganglion-pozitiv (≥ 4 ganglioni)	0–100	Crescut

13.5 Control al calității

Fiecare lot de componente ale testului Prosigna este testat folosind specificații prestabilite. Toate elementele la nivel de set sunt urmărite în funcție de lot, iar componentele esențiale conținute în fiecare set sunt testate împreună și eliberate sub forma unui lot de set Prosigna.

Setul de testare Prosigna include o serie de controale interne care sunt utilizate pentru a evalua calitatea fiecărui set de teste în ansamblu și a fiecărei probe în parte. Aceste controale sunt enumerate mai jos.

Set de control al loturilor: Proba de referință cu ARN transcris *In vitro*

O probă de referință de ARN sintetic este inclusă ca martor în setul testului Prosigna. Proba de referință este alcătuită din ținte ARN transcrise *in-vitro* din cele 50 de gene algoritmice și 8 gene menajere. Proba de referință este procesată în dublu exemplar la fiecare testare Prosigna, împreună cu un set de până la 10 probe de ARN de tumoare mamară necunoscută într-o bandă cu eprubete de reacție cu 12 godeuri. Semnalul de la proba de referință este analizat în raport cu limitele predefinite pentru validarea testului.

Semnalul de la fiecare dintre cele 50 de gene algoritmice din eșantionul de ARN al tumorii mamare este normalizat la genele corespunzătoare din proba de referință.

Set de control pozitiv: Ținte de ARN transcris *in vitro* și sondele de captură și raportoare corespunzătoare

Țintele ARN sintetice sunt utilizate ca și controale pozitive (PC) pentru testul Prosigna. Secvențele țintă PC sunt derivate din biblioteca de secvențe ADN a Consorțiului extern de control al ARN (ERCC)⁶. Țintele ARN sunt transcrise *in-vitro* din plasmide de ADN. Șase ținte de ARN sunt incluse în setul de testare într-o serie de titruri multiplicare de 4 ori (concentrație finală de 128-0,125 fM în reacția de hibridizare), împreună cu sondele de captură și raportoare corespunzătoare. PC sunt adăugate la fiecare probă de ARN de tumoare mamară și la proba de referință testate cu testul Prosigna. O probă va fi descalificată pentru continuarea analizei în cazul în care intensitatea semnalului de la PC nu respectă limitele predefinite.

Set de control negativ: sonde exogene fără ținte

Secvențele de control negativ sunt derivate din biblioteca de secvențe ADN a Consorțiului extern de control al ARN (ERCC)⁶. Sondele concepute pentru a detecta aceste secvențe țintă sunt incluse în setul de analiză fără secvența țintă corespunzătoare. Controalele negative (NC) sunt adăugate la fiecare probă de ARN de tumoare mamară și la proba de referință testate cu testul Prosigna drept măsură de control al calității. Proba va fi descalificată de la analiza ulterioară dacă intensitățile semnalului de la NC nu satisfac limitele predefinite.

Set de control al integrității ARN: Gene menajere

Sondele de captură și raportoare concepute pentru a detecta 8 gene menajere și 50 de gene algoritmice sunt incluse în setul Prosigna. Nivelurile de expresie ale celor 8 gene menajere sunt analizate pentru a determina calitatea ARN-ului extras din proba de țesut FFPE și introdus în testul Prosigna. Proba va fi descalificată pentru continuarea analizei în cazul în care nivelurile de expresie ale genelor menajere se situează sub limitele prestabilite.

Genele menajere sunt, de asemenea, utilizate pentru a normaliza orice diferențe în cantitatea de ARN intact dintr-o probă înainte de normalizarea probei de referință.

14 LIMITĂRI DE PROCEDURI

1. Testul Prosigna a fost optimizat pentru a identifica subtipul intrinsec al unei tumori de cancer mamar și riscul de recidivă la distanță la 10 ani al pacientului sub forma unui scor ROR și a unei categorii de risc, utilizând ARN purificat extras din țesut mamar uman fixat în formol și încastrat în parafină. Alte tipuri de specimene sau de fixatori nu au fost testate și nu trebuie utilizate.
2. Performanța testului Prosigna a fost validată utilizând doar procedurile furnizate în acest prospect. Modificările aduse acestor proceduri pot altera performanța testului.
3. Caracteristicile de performanță ale testului Prosigna au fost stabilite pentru femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân, cu receptori hormonalni pozitivi în stadiu incipient, tratate cu 5 ani de terapie endocrină adjuvantă. Performanța cu alte regimuri de tratament sau la alte populații de pacienți nu a fost stabilită.
4. Dacă la testare se adaugă ARN de calitate sau cantitate insuficientă, este posibil ca testul Prosigna să nu poată oferi un rezultat valid și, în schimb, să raporteze un eșec al testului.
5. Interpretarea rezultatelor testului Prosigna(subtip intrinsec, scor ROR, categorie de risc) trebuie evaluată în contextul altor factori clinico-patologici, al istoricului medical al pacientului și al oricăror alte rezultate ale testelor de laborator.
6. Performanța analizei Prosigna a fost stabilită cu ARN care îndeplinește specificațiile definite în legătură cu procedura de mai sus. Performanța cu ARN izolat care nu satisface aceste specificații nu a fost stabilită.
7. Substanțele cunoscute care interferează cu testul Prosigna includ ADN genomic și țesut netumoral (de exemplu, țesut normal). Vă rugăm să consultați considerațiile generale privind testul înainte de a începe procedura. Zona de carcinom invaziv viabil trebuie să fie identificată clar de către un medic anatomo-patolog înainte de efectuarea procedurii. În plus, fiecare probă de ARN trebuie tratată cu DNază. Înainte de a continua cu probele de testare ale pacienților, fiecare lot nou de DNază trebuie testat și validat conform specificațiilor furnizate atunci când se utilizează un alt kit de izolare decât setul de izolare a ARN-ului Roche FFPE.

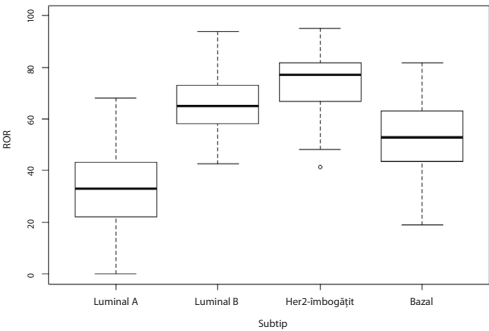
15 VALORI PRECONIZATE

Testul Prosigna raportează un scor ROR (0-100), un subtip intrinsec (Luminal A, Luminal B, HER2-îmbogățit sau bazal) și o clasificare a riscului (scăzut, intermediar sau ridicat) pentru fiecare probă de tumoare. Pe baza celor două studii de validare clinică descrise mai jos, la femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân HR+, în stadiu incipient, tratate cu anastrozol sau tamoxifen în cadrul studiilor ATAC și ABCSG-8, sunt prezentate intervalul și frecvența scorurilor ROR (figura 10), relația continuă a ROR cu probabilitatea de recidivă la distanță în funcție de statutul ganglionar (Figura 11) și distribuția scorurilor ROR în funcție de subtipul intrinsec (Figura 9) care sunt estimate. Pe baza acestor studii de validare clinică, supraviețuirea fără recidivă la distanță pe o perioadă de 10 ani, în funcție de clasificarea riscului, este reprezentată în Figura 12 (pacienți cu ganglioni negativi) și în Figura 13 (pacienți cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)).

15.1 Intervalul ROR în funcție de subtip

Figura 9 prezintă o diagramă cu casete a scorului ROR în funcție de subtipul intrinsec.

Figura 9: Diagramă cu casete a scorului ROR în funcție de subtipul intrinsec



15.2 Frecvența scorului ROR în funcție de statutul ganglionar

Histograma din Figura 10 a fost generată folosind un singur model Cox care a inclus scorul ROR și variabile categorice pentru a distinge cele trei grupuri de implicare ganglionară.

Figura 10: Histograma scorului ROR și a grupurilor de status ganglionar

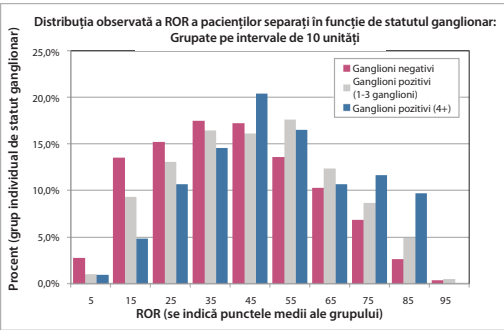
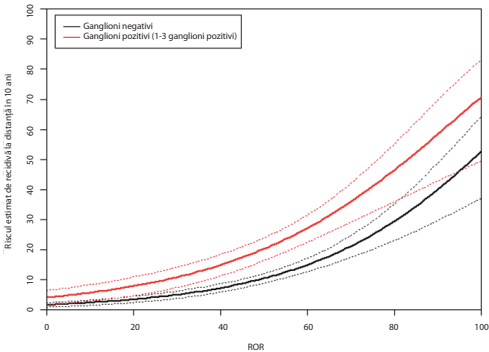


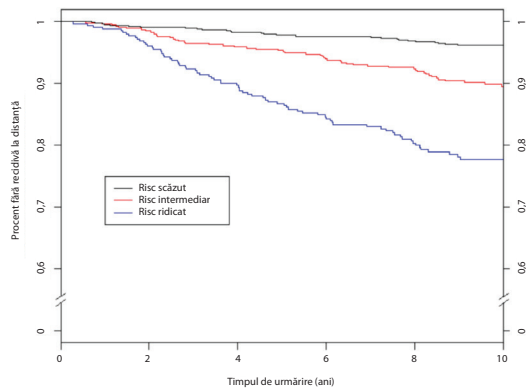
Figura 11: Riscul preconizat la zece ani estimat în cadrul grupului de status ganglionar



15.3 Supraviețuirea fără recidivă la distanță în funcție de clasificarea riscului

Următoarele date provin din analiza combinată a studiilor TransATAC și ABCSG-8. Pentru alocarea pacienților în grupuri de risc, scorurile ROR au fost comparate cu pragurile de risc predefinite pentru pacienții cu ganglioni negativi sau pozitivi. Figurile 12 și 13 prezintă supraviețuirea fără recidivă la distanță la 10 ani pentru fiecare grup de categorii de risc, în funcție de statutul ganglionar.

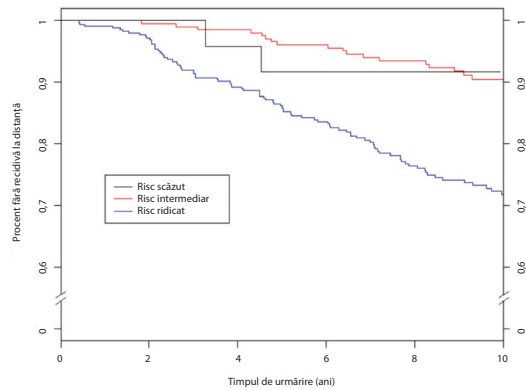
Figura 12: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 12: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [IÎ 95%]
Scăzut	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Intermediar	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Crescut	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Total	1.786 (100%)	157	

Figura 13: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)



Rezumat al datelor pentru Figura 13: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [IÎ 95%]
Scăzut	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Intermediar	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Crescut	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Total	590 (100%)	107	

Tabelul 10: Ratele SFRD la zece ani pentru pacienții cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi

Grup de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [IÎ 95%]
Crescut	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

16 CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

16.1 Precizia și reproductibilitatea analitice

Pentru a estima precizia și reproductibilitatea generale ale Prosigna, au fost efectuate două studii, iar rezultatele au fost combinate. Primul studiu efectuat a fost un studiu de precizie pe sistemul de analiză nCounter, pornind de la ARN extras din tumori mamare, iar al doilea studiu a fost un studiu de reproductibilitate pornind de la țesut de tumori mamare FFPE care a inclus factori preanalitici.

Precizia ARN

16.1.1 Structura studiului

A fost efectuat un studiu comparativ randomizat și în regim orb în trei centre cu testul Prosigna pe sistemul de analiză nCounter pentru a evalua precizia analitică. Au fost generate cinci probe de ARN de tumori mamare din specimene FFPE arhivate pentru a fi testate în fiecare centru. Panoul de probe a reprezentat profilurile prototip de expresie genetică întâlnite în timpul testelor de rutină și fiecare grup de clasificare a riscului.

Fiecare centru a efectuat 18 cicluri valide (9 cicluri de către fiecare operator, fiecare ciclu constând din 10 teste), după un ciclu de familiarizare efectuat de fiecare operator (Tabelul 11). Fiecare probă a fost testată în dublu exemplar în timpul fiecărei serii la nivelul nominal de intrare a ARN-ului de 250 ng pentru test. Fiecare operator a efectuat câte o rulare într-o anumită zi, în conformitate cu standardul general acceptat pentru metodele pe termen lung⁷. Perioada totală de studiu, inclusiv familiarizarea, a acoperit mai mult de 4 săptămâni în fiecare centru.

Tabelul 11: Prezentare generală a studiului de precizie ARN

Variabila studiului	Cifre
Număr de probe de ARN de tumori mamare	5
Număr de replici de probă per serie (aceiași cartuș)	2
Număr de rulări/centru	18
Număr de rulări/zi	1
Număr de operatori/centru	2
Număr de loturi de reactivi/centru	3
Număr de centre	3
Numărul total de probe testate pe centru (cu excepția familiarizării)=	180
Număr total de probe =	540

16.1.2 Analiza componentelor varianței

Tabelul 12 prezintă rezultatele analizei componentelor varianței pentru fiecare membru al panoului. Sub varianța estimată se află procentul de varianță totală (în paranteze).

Tabelul 12: Componentele varianței în funcție de membrul panoului (probă de ARN cumulat)

Membru al panoului în funcție de risc, subtip	ROR mediu	Componenta varianței					Varianța totală	AS totală
		Lot	Centru	Operator	Rulare	În cadrul rulării		
Luminal A scăzut	31,4	0,010 (2%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (30%)	0,296 (67%)	0,44 (100%)	0,66
Luminal B intermediar	55	0,105 (18%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (8%)	0,426 (74%)	0,576 (100%)	0,76
Bazal intermediar	55,4	0,059 (20%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (15%)	0,194 (65%)	0,299 (100%)	0,55
Luminal B crescut	64,8	0,119 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,380 (66%)	0,576 (100%)	0,76
HER2-îmbogățit crescut	76,2	0,165 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (63%)	0,442 (100%)	0,66

Pentru toate cele cinci componente ale panelului, abaterea standard totală a fost mai mică de 1 unitate ROR pe o scară de 0-100. Pentru toate componentele panelului, cea mai mare parte a varianței a provenit din varianța în interiorul ciclului (repetabilitate). Aproape că nu a existat nicio varianță de la un centru la altul sau de la un operator la altul. Un test al raportului de probabilitate pentru determinarea semnificației centrului în funcție de componenta panelului a demonstrat că diferențele dintre locurile de desfășurare au fost nesemnificative din punct de vedere statistic (p > 0,05). Pentru fiecare lot, scorurile medii ROR sunt la mai puțin de 1 unitate ROR de diferență pentru fiecare componentă a panelului, contribuind în medie cu aproximativ 20% la varianța globală.

16.1.3 Concordanța probei genotipate în funcție de subtip și categoria de risc

Pentru toate componentele panelului, a existat o concordanță de 100% între rezultatul subtipului și subtipul intrinsec al componentei panelului. Pentru toate probele, a existat o concordanță de 100% între grupul de risc măsurat și cel estimat.

Reproductibilitatea țesuturilor

16.1.4 Structura studiului

Un studiu comparativ randomizat și în regim orb în trei centre, în care au fost testate cu ajutorul sistemului de analiză nCounter, folosind testul Prosigna, a fost efectuat pe trei probe de țesut tumoral mamar prelevate din același bloc FFPE. În cadrul studiului, a fost testat un set de 43 de probe de tumori mamare FFPE recent stocate în bănci, provenite de la pacienți cu cancer de sân cu receptori hormonal pozitivi, cu carcinom ductal și/sau lobular invaziv confirmat. Toate probele de țesut au fost trimise la centrul de testare corespunzător pentru procesare. Cele 43 de specimene au fost examinate independent de trei medici anatomopatologi diferiți. Pentru fiecare probă de țesut examinată din punct de vedere patologic, un singur operator a efectuat o serie de teste constând în macrodisecția țesutului, extracția ARN și testarea cu testul Prosigna în fiecare centru, utilizând procedura de testare definită. ARN-ul izolat din fiecare dintre probele de țesut a fost testat de două ori în teste separate. Pentru realizarea acestui studiu au fost utilizate trei loturi de kit de izolare a ARN (unul pentru fiecare centru) și un singur lot de reactivi pentru setul de analiză. O singură lamă a fost introdusă pentru extracția ARN atunci când suprafața tumorii măsura ≥100 mm², iar 3 lamele au fost introduse atunci când suprafața tumorii măsura <100 mm², fiind necesară o suprafață tumorală minimă de 4 mm².

16.1.5. Rezumatul testelor

Rata de detectare (procent de probe genotipate) pentru cele 43 de probe de țesut evaluate în fiecare dintre cele trei centre este prezentată în tabelul 13.

Tabelul 13: Rata de detectare în fiecare centru

Centru	Procentul care furnizează rezultate	Pozitiv/Total
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

Patruzeci de probe au dat rezultate în toate centrele (izolarea ARN a unei probe într-un centru a necesitat repetarea), 1 specimen a generat rezultate în 2 centre, iar 2 specimene au generat rezultate într-un singur centru. Sută la sută (100%) dintre probele care au trecut de specificațiile de examinare a țesuturilor și de izolare a ARN-ului au generat rezultate pozitive la testul Prosigna. Suprafața tumorală măsurată pentru 4/5 eșecuri de izolare a ARN-ului a fost ≤15 mm², ceea ce echivalează cu mai puțin de 50 mm² de țesut total prin suprafața introdusă în test.

Cele 43 de specimene au inclus atât pacienți cu ganglioni negativi, cât și pacienți cu ganglioni pozitivi. Rezultatele calculate ale testelor din cele 43 de probe reprezintă o gamă largă (94 de unități) de scoruri ROR, toate cele 4 subtipuri intrinseci și toate categoriile de risc atunci când se aplică valorile limită negative sau pozitive la ganglionii la toate probele. Cele două probe cu rezultate la un singur centru au fost excluse din toate analizele statistice ulterioare, deoarece nu existau date disponibile pentru a face comparații între centre.

16.1.6 Analiza componentelor varianței

Nu au existat diferențe semnificative din punct de vedere statistic (α = 0,05) între categoriile de risc, utilizând un test Kruskal-Wallis non-parametric, astfel încât modelul componentelor varianței a fost adaptat simultan la toate categoriile de risc.

Tabelul 14 prezintă rezultatele analizei componentelor varianței utilizând toate cele 41 de specimene de țesut.

Tabelul 14: Componentele varianței (Studiu de reproductibilitate a țesuturilor)

Componentele varianței				AS totală
Centru	În bloc	Rezidual	Total	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Componenta „centru” măsoară variația sistematică specifică centrului, componenta „În bloc” măsoară varianța aleatorie care diferă în funcție de revizuirea/procesarea specimenelor de țesut sau de varianța din cadrul blocului FFPE, și varianța reziduală măsoară variabilitatea combinată de la o serie la alta și variabilitatea din cadrul seriei în cadrul testului Prosigna. Componenta centrului este foarte mică în raport cu variabilitatea aleatorie din cadrul blocului, ceea ce indică faptul că diferențele medii dintre centre au fost neglijabile (<1% din varianța totală). Varianța reziduală a fost în concordanță cu variabilitatea echivalentă măsurată în cadrul studiului de precizie ARN, care a avut mai puține probe, dar mai multe măsurători repetate (varianță de 0,51, comparativ cu o varianță medie de 0,39 pentru un singur loc în cadrul lotului de reactivi Prosigna pentru studiul de precizie ARN).

Tabelul 15 rezumă variabilitatea totală folosind suma variabilității procesării țesuturilor (componentele de la nivelul centrului și din cadrul blocului din Tabelul 14 din acest studiu), precum și variabilitatea totală a prelucrării ARN din studiul de precizie a ARN (media celor cinci componente ale panelului testat în Tabelul 12). Factorii preanalitici asociați cu procesarea țesuturilor reprezintă principala sursă de variație pentru test (94% din variația totală). AS totală incluzând toate sursele de variație este egală cu 2,9, ceea ce indică faptul că testul Prosigna este o măsură fiabilă a diferenței dintre două valori ROR de 6,75 cu o încredere de 95%.

Tabelul 15: Variabilitatea totală (procesarea țesuturilor și a ARN-ului)

Variabilitatea procesării țesuturilor	Variabilitatea procesării țesuturilor	Variabilitate totală	AS totală
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Concordanța categoriei de risc și clasificările subtipului

Concordanța de la un centru la altul în funcție de subtipul de pacient și de clasificarea riscului (risc scăzut/intermediar/risc ridicat) este prezentată în Tabelul 16, în care valorile limită de risc respective pentru clasificările ganglionilor negativi și ale ganglionilor pozitivi au fost aplicate la toate probele. Între paranteze sunt indicate intervalele de încredere exacte de 95%, iar între paranteze este indicat numărul de probe cu rezultate în ambele centre. Concordanța medie este prezentată în ultima coloană. Pentru fiecare comparație, concordanța a fost calculată în două etape. În primul rând, pentru fiecare probă de țesut, s-a calculat proporția celor patru perechi de rezultate posibile (două la centrul 1 * două la centrul 2) care au fost de acord. În a doua etapă, aceste proporții au fost calculate ca medie pentru toate probele de țesut care au generat rezultate în ambele centre în comparația respectivă.

Tabelul 16: Rezumatul concordanței dintre subtip și categoria de risc în funcție de statusul ganglionar

Tip de comparație	Concordanța perechilor			Concordanță medie
	Centrul 1 vs. Centrul 2 (n = 40)	Centrul 1 vs. Centrul 3 (n = 41)	Centrul 2 vs. Centrul 3 (n = 40)	
Subtip	96,3% [86,4%-99,5%]	98,8% [91,0% - 100%]	95% [83,1% - 99,3%]	97%
Categoria de risc ganglionar negativ	87,5% [73,2% - 95,8%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	90% [76,4% - 97,2%]	90%
Categoria de risc ganglionar pozitiv	88,8% [75,9% - 96,0%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	91,3% [79,2% - 97,4%]	91%

Pentru fiecare comparație (subtip și categorii de risc ganglionar-negativi și ganglionar-pozitivi), concordanța medie între locații a fost de cel puțin 90%. Nu au existat probe în care categoria de risc să se fi schimbat de la risc scăzut la risc ridicat (sau viceversa) între sau în cadrul centrelor. Au existat doar două specimene (din 41) care nu au generat subtipuri identice în toate cele 6 replicări:

1. Un specimen a avut rezultate Luminal A duplicate la un centru și rezultate Luminal B duplicate la fiecare dintre celelalte două centre.
2. Un specimen a avut rezultate Luminal A duplicate la un centru, rezultate HER2-îmbogățit duplicate la un alt centru și un rezultat pentru Lumina A și HER-2-îmbogățit la cel de-al treilea centru.

16.2 Sensibilitate / informații ARN

Descrierea studiului de intrare ARN

Studiul a testat 13 probe de ARN din tumori mamare la trei niveluri de intrare de ARN care se încadrează în specificațiile testului (500, 250 și 125 ng) și două niveluri suplimentare de intrare de ARN care nu se încadrează în specificații (625, 62,5 ng). Fiecare probă a fost testată cu fiecare lot de kit (2 loturi în total) într-o singură serie de teste care a inclus măsurători duplicate la fiecare nivel din specificații și o singură măsurătoare pentru fiecare nivel în afara specificațiilor. În fiecare test au fost incluse măsurători în alb (adică fără țintă) în dublu exemplar. O singură probă a fost testată cu un singur lot.

Rezultatele studiului de intrare ARN

Toate probele goale măsurate (n = 46) au fost cu mult sub pragul de semnal și au generat un rezultat negativ al testului (call rate de 0%). Toate măsurătorile de ARN tumoral care se încadrează în specificațiile testului (n = 138) au dat un rezultat pozitiv al testului (call rate de 100%). O sută la sută (100%) din speciimenele cu valori peste specificație (625 ng) au generat un rezultat pozitiv. Optzeci și trei la sută (83%) din speciimene (10/12) testate la valori sub specificație (62,5 ng) au generat un rezultat al testului în lotul 1 și 100% în lotul 2.

Scorul mediu ROR pentru cele 13 probe a acoperit un interval larg (20-82). Clasificarea grupului de risc (scăzut/intermediar/inalt) a fost 100% concordantă la toate nivelurile de valori ale ARN-ului pentru cele 13 probe testate. Tabelul 17 sintetizează variația scorului ROR în funcție de aportul de ARN. Diferența medie a scorului ROR între nivelurile de valori

ARN, AS pentru diferențe și intervalul de încredere de 90% au fost utilizate pentru a evalua dacă scorurile ROR generate de diferite niveluri de valori de ARN erau echivalente cu cele generate folosind nivelul țintă de 250 ng. Pentru a îndeplini criteriul de acceptare, intervalul de încredere trebuia să fie complet conținut de (-3,3 ROR). La cele două niveluri de la extremele intervalului de specificații al testului (125 și 500 ng ARN), scorurile ROR au fost echivalente cu cele obținute la concentrația valorilor țintă de 250 ng pentru fiecare dintre cele două loturi de seturi testate. Pentru fiecare nivel în afara specificației analizei, scorurile ROR au fost echivalente pentru unul dintre loturi, dar nu și pentru celălalt.

Tabelul 17: Rezumat al diferenței de scor ROR. Număratoarea este egală cu numărul de probe incluse în analiză.

Lot set	Masa (ng)	Număr	Diferența ROR medie	AS de diferență	Limita inferioară de încredere	Limita superioară de încredere
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

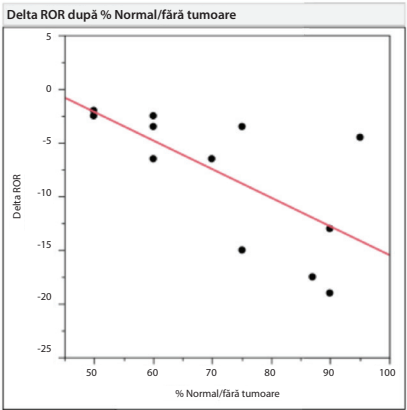
16.3 Testarea interferențelor

Țesut adiacent normal/non-tumoral

Țesutul mamar adiacent normal/non-tumoral este prezent în mod obișnuit în blocurile de tumori mamare FFPE și poate fi identificat la examinarea patologică ca o zonă distinctă de zonă de carcinom mamar invaziv. Procedura testului Prosigna de mai sus specifică îndepărtarea țesutului normal adiacent prin macrodisecție. Pentru a evalua riscul de contaminare cu țesut normal a rezultatelor testului, un total de 13 blocuri de tumori mamare FFPE care conțineau carcinom ductal infiltrant confirmat patologic și aproximativ 50-95% de țesut normal/non-tumoral înconjurător au fost testate cu și fără macrodisecția țesutului înconjurător și s-a determinat diferența de scor ROR (delta ROR).

În medie, ROR din proba de tumoare obținută prin macrodisecție a avut ROR cu aproape 8 unități mai mare decât cea observată în cazul în care nu a fost îndepărtat țesutul normal/non-tumoral. Figura 14 ilustrează faptul că, pe măsură ce crește cantitatea de țesut normal (până la 95% care nu este îndepărtat prin macrodisecție), există un risc tot mai mare ca scorul ROR raportat să fie o estimare subestimată sau denaturată negativ (până la -19 unități ROR) a riscului de recidivă al unui pacient.

Figura 14: Impactul țesutului normal/non-tumoral asupra Delta ROR



Interferențe de țesut necrotic, hemoragic și DCIS

Pentru a evalua riscul de contaminare necrotică/hemoragică/DCIS a rezultatelor testului, un total de 11 blocuri de tumori mamare FFPE (3 DCIS, 5 necrotice, 3 hemoragice) care conțineau carcinom mamar invaziv confirmat patologic și aproximativ 10-30% din interferent au fost testate cu și fără macrodisecția interferentului și s-a determinat diferența de scor ROR (delta ROR). La nivelurile testate, efectul țesutului cu sânge/hemoragic, DCIS și al țesutului necrotic inclus în procedură a avut un impact neglijabil asupra scorului ROR raportat (< 6 unități ROR). A existat o concordanță de 100% în ceea ce privește alocarea categoriei de risc între cele unsprezece probe necrotice, hemoragice și DCIS cu și fără macrodisecție.

ADN genomic uman

Procedura de testare Prosigna include îndepărtarea ADN-ului genomic uman (ADNg) prin digerare cu DNază I. Pentru a evalua riscul de contaminare cu ADNg a rezultatelor testului, zece (10) blocuri de tumori mamare FFPE conținând carcinom ductal infiltrativ confirmat patologic au fost testate +/- îndepărtarea ADN genomic uman, prin omiterea etapei cu DNază din cadrul procedurii. În probele testate, în medie, scorul ROR a fost cu 4 până la 5 unități mai mic în grupurile de risc scăzut și intermediar atunci când ADNg este eliminat cu DNază I (a se vedea Tabelul 18). Atunci când probele care nu au fost tratate cu DNază au fost ulterior tratate cu DNază I (post-tratament), scorurile ROR au corespuns valorilor ROR observate inițial cu tratamentul cu DNază conform protocolului. Există riscul ca scorul ROR raportat să fie o estimare punctuală supraestimată sau pozitiv distorsionată (până la 7 unități ROR) a riscului de recidivă al unui pacient în prezența ADNg. În plus, semnalul calculat pentru probele fără tratament cu DNază I a fost semnificativ (p <0,05) mai mic decât cel al probelor tratate cu DNază I, din cauza interferenței în citirea absorbției utilizate pentru a cuantifica cantitatea de ARN înainte de testarea cu testul Prosigna.

Tabelul 18: Impactul tratamentului cu DNază asupra ROR în probele tumorale

Categoria ROR	Specimene FFPE testate	Diferența ROR cu DNază I - fără DNază I			Diferența ROR cu DNază I - fără DNază I (post-tratament)		
		Medie	Min	Max	Medie	Min	Max
Scăzut	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Intermediar	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Crescut	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Performanță clinică

Au fost efectuate două studii de validare clinică pentru a valida testul Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature. Obiectivul principal al ambelor studii a fost de a valida observațiile publicate conform cărora scorul riscului de recidivă (ROR) oferă informații prognostice suplimentare pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță la 10 ani, în plus față de variabilele clinice standard. De asemenea, un obiectiv secundar al ambelor studii a vizat validarea observațiilor anterioare conform cărora pacienții cu subtip Luminal A și Luminal B au o supraviețuire fără recidivă la distanță la 10 ani semnificativ diferită din punct de vedere statistic. Deoarece criteriile de intrare și rezultatele acestor două studii au fost similare, cele două baze de date au fost combinate și analizate cu un plan de analiză definit prospectiv care a avut aceleași obiective ca și studiile individuale

Analiza combinată: Generarea curbelor de risc utilizând rezultatele combinate ale testului Prosigna din TransATAC și ABCSG-8

Un rezumat al tratamentului și al caracteristicilor clinice din analiza combinată poate fi găsit mai jos. Pentru informații privind structura și analiza fiecărui studiu în parte, vă rugăm să consultați următoarele secțiuni pentru studiile 1 și, respectiv, 2.

Analiză

Tabelul 19: Rezumatul tratamentului și al caracteristicilor clinice în analiza combinată a studiilor 1 și 2

Caracteristică	Valoare	Ganglioni-negativi (n = 1.786)		1-3 ganglioni pozitivi (n = 590)		≥4 ganglioni pozitivi (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1.047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Tratament	Puțin	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Numai	362 (49,0%)	519 (49,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
	Tamoxifen						
Clasa	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%)
Dimensiunea tumorii	≤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%)
Statutul HER2	Negativ	649 (87,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	367 (96,1%)	47 (87,0%)	46 (93,9%)
	Pozitiv	90 (12,2%)	63 (6,0%)	22 (10,6%)	15 (3,9%)	7 (13,0%)	3 (6,1%)
Recidive	La distanță	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Oricare	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	73 (19,1%)	34 (63,0%)	10 (20,4%)
Subtip intrinsec NanoString	Luminal A	529 (71,6%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Luminal B	176 (23,8%)	284 (27,1%)	68 (32,7%)	118 (30,9%)	20 (37%)	16 (32,7%)
	Bazal	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2-îmbogățit	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Ambale studii au avut un braț de tratament constând în 5 ani de Tamoxifen. În TransATAC, celălalt braț de studiu a constatat în 5 ani de Anastrozol, în timp ce în studiul ABCSG-8 al doilea braț a constatat în 2 ani de Tamoxifen urmat de 3 ani de Anastrozol. Atunci când recidiva la distanță (RD) a fost modelată ca o funcție a tuturor variabilelor clinice și de tratament, tratamentul nu a contribuit semnificativ (p = 0,66) ca factor de predicție al RD. Celelalte diferențe principale dintre aceste studii au fost faptul că studiul TransATAC a inclus pacienți cu tumori de gradul 3 și că rata generală de recidivă a fost mai mare în studiul TransATAC decât în studiul ABCSG-8.

Rezultate

Figura 15 prezintă riscul de RD la 10 ani în funcție de scorul ROR, cu intervale de încredere de 95%, pe baza unor modele separate de pericol proporționale Cox pentru fiecare dintre grupurile de pacienți cu ganglioni negativi și cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni pozitivi).

Figura 15: Riscul de RD estimat la zece ani în funcție de starea ganglionului, cu intervale de încredere de 95%.

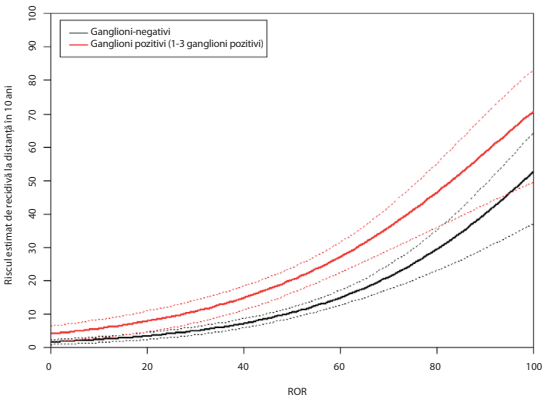
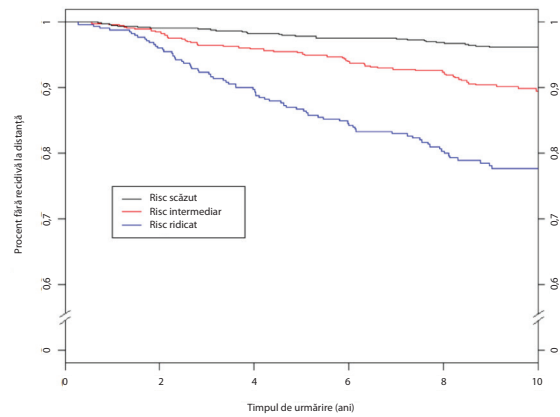


Figura 16 prezintă diagramele Kaplan-Meier și de incidență în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi, iar Figura 17 prezintă aceleași diagrame pentru pacienții cu 1-3 ganglioni pozitivi. În fiecare figură, sunt furnizate detalii privind dimensiunea probelor, numărul de evenimente și procentul estimat fără recidivă la distanță la 10 ani, în funcție de grupul de risc. În grupul de pacienți cu ganglioni pozitivi,

au existat foarte puțini pacienți în grupurile de risc scăzut predefinite, ceea ce a făcut ca intervalul de încredere al curbei Kaplan-Meier și, prin urmare, estimarea SFRD la 10 ani să fie foarte largă.

Figura 16A: SFRD în funcție de grupa de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 16A: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Intermediar	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Crescut	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Total	1.786 (100%)	157	

Figura 16B: Incidența pe grupuri de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi în intervale de cinci ani

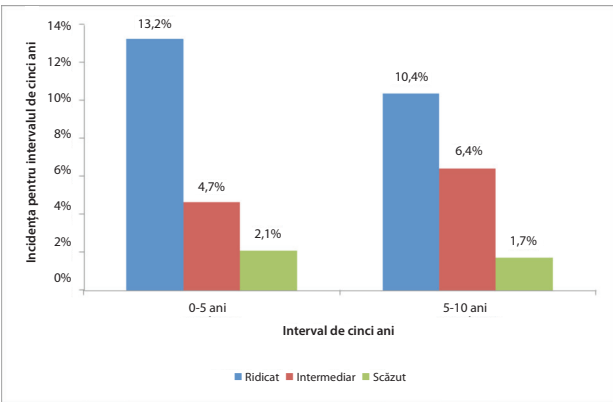
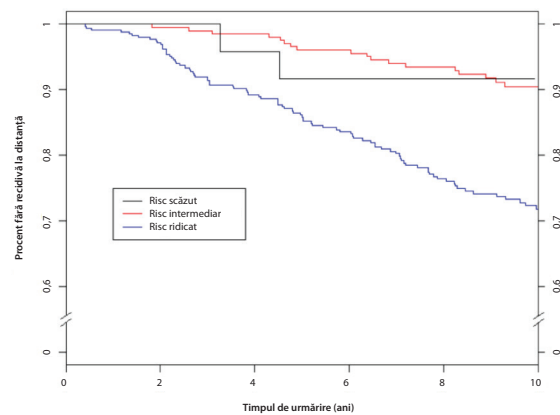


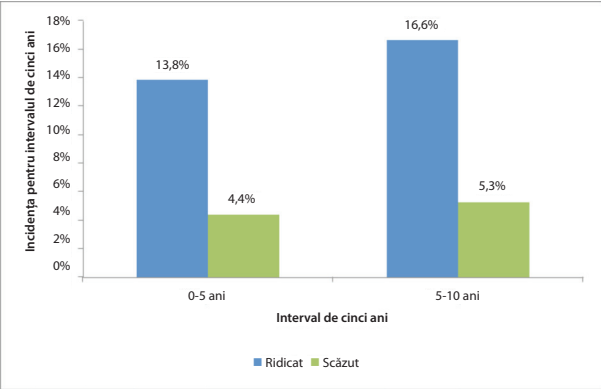
Figura 17A: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1 până la 3 ganglioni pozitivi



Rezumat al datelor pentru Figura 17A: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1 până la 3 ganglioni pozitivi

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Intermediar	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Crescut	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Total	590 (100%)	107	

Figura 17B: Incidența pe grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) în intervale de cinci ani



În figura 17B, deoarece au existat doar 24 de pacienți cu 2 evenimente în grupul de pacienți cu risc scăzut cu ganglioni pozitivi, acești pacienți au fost combinați cu pacienții intermediari pentru analiza recidivei tardive.

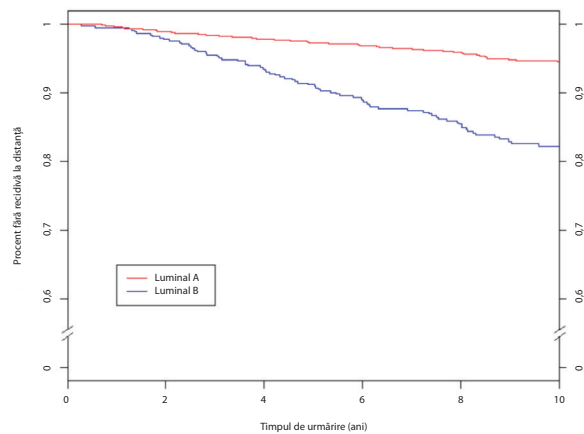
Toți cei 103 pacienți din baza de date combinată cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi sunt clasificați ca fiind cu risc ridicat. Tabelul 20 prezintă ratele SFRD la zece ani pentru acești pacienți.

Tabelul 20: Ratele SFRD la zece ani pentru pacienții cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Crescut	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

Majoritatea subiecților din studiile combinate (96%) au fost de subtip fie Luminal A, fie Luminal B. Figura 18 prezintă o comparație a SFRD în funcție de subtipul Luminal pentru pacienții cu ganglioni negativi.

Figura 18: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni negativi

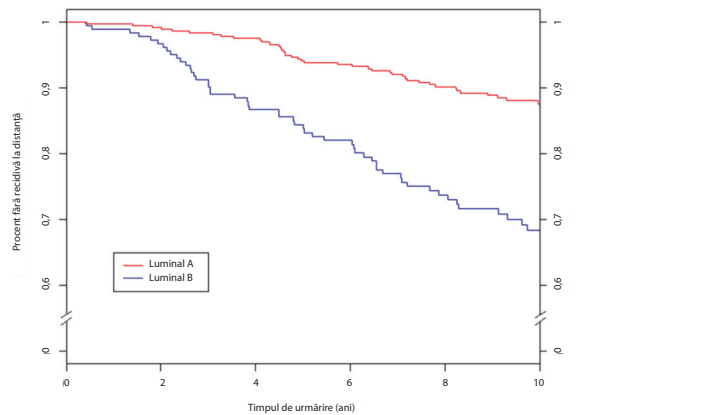


Rezumat al datelor pentru Figura 18: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Luminal A	1.254	62	94,6 [93,1 - 95,8]
Luminal B	460	75	81,9 [77,7 - 85,3]
Total	1.714	137	

Figura 19 prezintă aceeași comparație pentru pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1-3 ganglioni pozitivi. Pentru ambele grupuri, au existat diferențe semnificative între SFRD la pacienții Luminal A și Luminal B.

Figura 19: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1-3 ganglioni pozitivi



Rezumat al datelor pentru Figura 19: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1-3 ganglioni pozitivi

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Luminal A	375	41	87,6 [83,5 - 90,8]
Luminal B	186	52	68,3 [60,4 - 75,0]
Total	561	93	

În baza de date combinată au existat doar 98 de pacienți de subtip luminal cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi. Tabelul 21 prezintă ratele SFRD la zece ani pentru acești pacienți care prezintă, de asemenea, un risc mult mai mare atunci când au un subtip Luminal B.

Tabelul 21: Ratele SFRD la zece ani pentru pacienții cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi în funcție de subtipul luminal

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Luminal A	62	17	68,3 [53,6 - 79,3]
Luminal B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
Total	98	37	

Analiza recidivei tardive

În datele analizei combinate descrise anterior, ratele evenimentelor în cadrul fiecărui grup de risc nu sunt constante pe parcursul intervalului de 10 ani, după cum se poate observa în Figurile 16B și 17B. Pentru a înțelege mai bine RD în perioada de recidivă tardivă, a fost efectuată o analiză retrospectivă post-hoc a datelor combinate descrise mai sus pentru subgrupul de pacienți care nu au prezentat recidivă la distanță timp de cinci ani (un total de 2.163 de pacienți[®]). Dintre aceștia, 1.605 au fost pacienți cu ganglioni negativi și 488 au fost pacienți cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni pozitivi). Pentru fiecare grup de ganglioni, valorile de sub axa x în anul 5 din Figurile 20 și 21 arată numărul de pacienți pe grup de risc expuși riscului la cinci ani, adică eligibili pentru analiza recidivei tardive.

Tabelul 22 oferă un rezumat al tratamentului și al caracteristicilor clinice pentru pacienții cu ganglioni negativi și cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) din analiza recidivei tardive.

Tabelul 22: Rezumatul caracteristicilor clinice și de tratament pentru analiza recidivei tardive

Caracteristică	Valoare	Ganglioni negativi (n = 1.605)		Ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Tratament	Puțin Anastrozol	480	346	153	89
	Numai Tamoxifen	464	315	158	88
Clasa	Bine	192	158	46	36
	Moderat	752	394	265	105
	Slab	0	109	0	36
Dimensiunea tumorii	≤ 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
Statut HER2	Negativ	888	590	300	157
	Pozitiv	56	71	11	20
Recidive	La distanță	41	40	28	29
	Oricare	71	78	37	37
Subtip intrinsec NanoString	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Bazal	4	5	0	1
	HER2-îmbogățit	21	18	6	10

Obiectivul principal a fost de a evalua capacitatea scorului ROR de a furniza informații prognostice suplimentare semnificative pentru SFRD în plus față de variabilele clinice standard între anii 5-10. Un model nul constând doar în CTS a fost comparat cu un model alternativ constând în CTS și ROR, utilizând un test de raport de probabilitate (RP). ROR a adăugat informații semnificative din punct de vedere statistic pentru SFRD după 5 ani, în plus față de variabilele clinice standard pentru toți pacienții (p <0,0001), precum și pentru pacienții cu ganglioni negativi (p <0,0001) și cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) (p <0,0001).

Tabelul 23 prezintă un rezumat al rapoartelor de risc pentru o schimbare de 10 puncte pe baza unei analize univariate și a unei analize multivariate care a inclus atât scorul ROR, cât și CTS. Raporturile de risc pentru scorul ROR sunt toate semnificativ diferite de 1, chiar și după ajustarea pentru CTS. Indicii C sunt, de asemenea, prezentați în Tabelul 22. În cazul ambelor grupuri, indicele C a fost semnificativ diferit de valoarea de 0,5, valoarea fără informații.

Tabelul 23: Rezumat al testării recidivelor tardive

Număr de ganglioni pozitivi	N	Indice de risc: Modificarea scorului ROR cu 10 puncte		Indicele C cu intervale de încredere de 95%		
		Analiza univariată	Analiza multivariată	Indice C	Inferior	Superior
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%

Majoritatea pacienților din cele două studii au fost HER2-negativi. Tabelul 24 prezintă distribuția statutului HER2 pentru femeile cu ganglioni negativi și pentru cele cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni). În cazul ambelor grupuri, peste 90% dintre femeile participante la studii au fost HER2-negative.

Tabelul 24: Distribuția statutului HER2 în funcție de numărul de ganglioni pozitivi

Subset de pacienți	Statut HER2		Total
	Negativ	Pozitiv	
Pacienți cu ganglioni negativi	1.478 (92,1%)	127 (7,9%)	1.605
Pacienți cu ganglioni pozitivi cu 1 - 3 ganglioni pozitivi	457 (93,6%)	31 (6,4%)	488

Tabelul 25 prezintă o comparație între modelul multivariat ajustat la toți pacienții dintr-un anumit grup de ganglioni și modelul ajustat la toți pacienții HER2-negative din grup. Nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic.

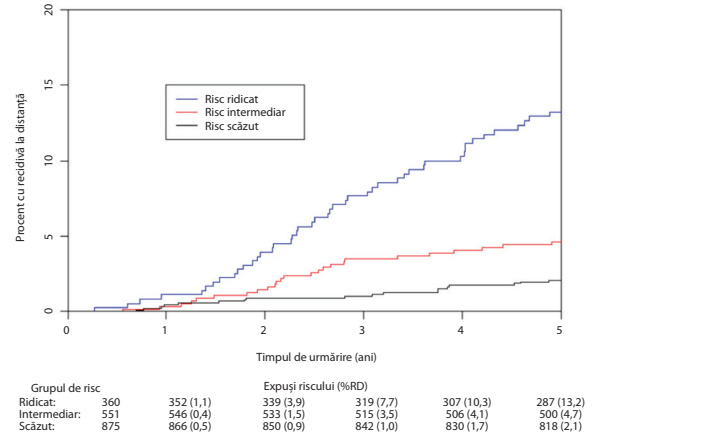
Tabelul 25: Coeficienți de risc multivariați pentru modificarea scorului ROR cu 10 puncte: Toți pacienții din cadrul subgrupului vs. pacienții HER2-negativi din cadrul subgrupului

Număr de ganglioni pozitivi	Toți pacienții [ÎI 95%]	Pacienți HER2-negativi [ÎI 95%]
Pacienți cu ganglioni negativi	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Pacienți cu ganglioni pozitivi cu 1 - 3 ganglioni pozitivi	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Comparația între grupele de risc este explorată în continuare în Figurile 20 și 21, care prezintă curbele de incidență pentru recidiva la distanță timpurie și tardivă construite în funcție de grupul de risc la pacienții cu ganglioni negativi și, respectiv, cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni). Curbele de incidență acoperă perioada de recidivă timpurie (în primii 5 ani) și perioada de recidivă tardivă (între 5 și 10 ani de la diagnostic). Imediat sub axa x, fiecare figură afișează numărul de femei expuse riscului și incidența cumulată. Tabelele rezumative de sub figuri arată intervalele de încredere pentru rata cumulativă de RD la 5 ani sau la 10 ani pentru acele femei care nu au avut RD după finalizarea a 5 ani de tratament. Pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) reprezentați în Figura 21, grupurile de risc scăzut și intermediar au fost combinate, având în vedere numărul mic de pacienți din grupul de risc scăzut.

Populația cu risc scăzut are o probabilitate scăzută de recidivă între anii 5 și 10 după 5 ani de tratament endocrin, după cum demonstrează curbele de incidență cumulată și indicii de risc asociați pentru fiecare grup de risc. În schimb, populațiile cu risc intermediar și ridicat prezintă un risc persistent de recidivă tardivă la distanță după 5 ani de tratament endocrin. Diferența de rezultat între populațiile cu risc intermediar și cu risc ridicat, cu ganglioni negativi, se stabilește în primii 5 ani (rata RD = 13,2% [9,6% - 16,7%] pentru pacienții cu risc ridicat și 4,7% [2,9% - 6,4%] pentru pacienții cu risc intermediar) și persistă până la 10 ani; cu toate acestea, ratele de recidivă pentru grupurile cu risc intermediar și cu risc ridicat după 5 ani de tratament endocrinologic sunt foarte asemănătoare.

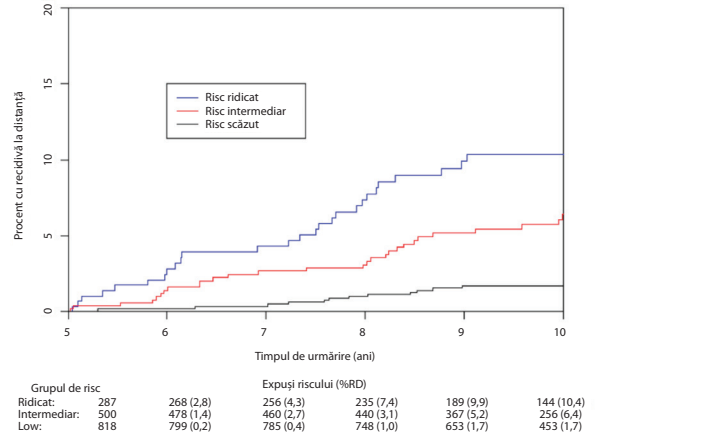
Figura 20A: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 20A: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni negativi

Ratele de RD în funcție de grupul de risc până la cinci ani de la finalizarea tratamentului [Intervale de încredere 95%]		
Crescut	Intermediar	Scăzut
13,2% [9,6% - 16,7%]	4,7% [2,9% - 6,4%]	2,1% [1,1% - 3,1%]

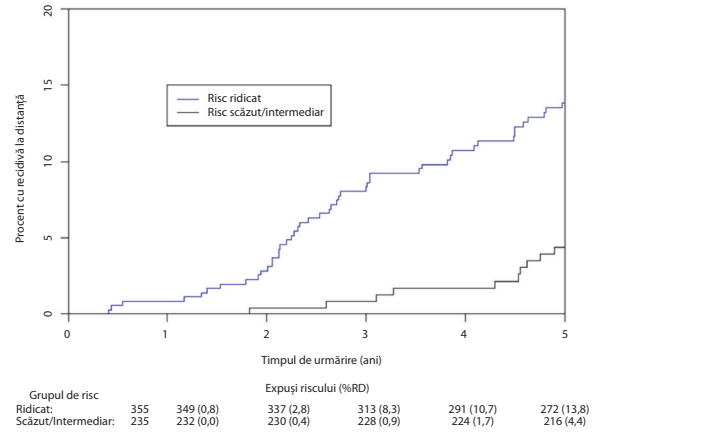
Figura 20B: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 20B: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni negativi

Ratele de RD în funcție de grupul de risc până la cinci ani de la finalizarea tratamentului fără RD [Intervale de încredere 95%]		
Crescut	Intermediar	Scăzut
10,4% [6,6% - 14%]	6,4% [4,1% - 8,7%]	1,7% [0,8% - 2,6%]

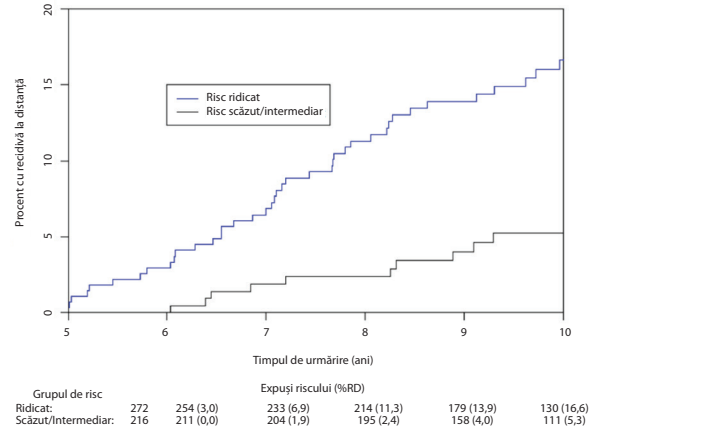
Figura 21A: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni-pozitivi (1-3 ganglioni)



Rezumat al datelor pentru Figura 21A: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni-pozitivi (1-3 ganglioni)

Ratele de RD în funcție de grupul de risc până la cinci ani de la finalizarea tratamentului [Intervale de încredere 95%]	
Crescut	Scăzut/Intermediar
13,8% [10,1% - 17,4%]	4,4% [1,7% - 7,0%]

Figura 21B: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni-pozitivi (1-3 ganglioni)



Rezumat al datelor pentru Figura 21B: Curbele de incidență pentru recidiva la distanță în funcție de grupul de risc de la 0-5 ani: Pacienți cu ganglioni-pozitivi (1-3 ganglioni)

Ratele de RD în funcție de grupul de risc până la cinci ani de la finalizarea tratamentului fără RD (Intervale de încredere 95%)	
Crescut	Scăzut/Intermediar
16,6% [11,7% - 21,3%]	5,3% [2,0% - 8,4%]

Concluziile analizei combinate:

S-a demonstrat că scorul ROR adaugă informații prognostice semnificative în perioada de recidivă tardivă, între 5 și 10 ani de la diagnosticare și peste variabilele clinice standard în studiul combinat pentru pacienții care nu au prezentat recidivă la distanță de până la cinci ani. Utilizând grupuri de risc definite la intrarea în studiu pentru fiecare dintre cohortele specifice numărului de ganglioni, s-a demonstrat că grupurile de risc clasifică întregul set de pacienți în grupuri cu un risc semnificativ diferit de recidivă tardivă la distanță. Atât analiza continuă, cât și cea bazată pe scorul ROR al grupului de risc au arătat informații prognostice similare în diferite subgrupuri. Nu au fost observate diferențe semnificative între rezultatele obținute la pacienții HER2-negativi în comparație cu toți pacienții.

În fiecare dintre studiile TransATAC și ABCSG-8, s-a demonstrat că ROR a adăugat informații prognostice semnificative în plus față de variabilele clinice și de tratament standard, atât atunci când a fost inclus ca măsurătoare continuă, cât și atunci când a fost inclusă folosind trei grupuri de risc predefinite. Cele două studii au avut profiluri de risc diferite, în sensul că rata evenimentelor a fost mai mare în studiul TransATAC decât în studiul ABCSG-8: acest lucru este clar prin compararea SFRD (%) în brațele de control ale ATAC (90,8%) și ABCSG8 (92,5%) raportate în literatura de specialitate^{9,10}. Această analiză a combinat datele provenite din cele două studii cu ponderi egale pentru a genera profiluri de risc care se estimează a fie mai ușor de generalizat la alte populații de pacienți față de rezultatele studiilor individuale.

Studiul 1: Predicția riscului de recidivă la distanță la femeile aflate în postmenopauză cu cancer de sân cu ganglioni pozitivi sau negativi, pozitive la receptorii hormonal, în stadiu incipient, tratate cu Arimidex sau Tamoxifen: un studiu TransATAC

Structura studiului

Studiul de validare clinică a fost conceput să valideze faptul că scorul riscului de recidivă (ROR) oferă informații prognostice suplimentare pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță (SFRD), în plus față de variabilele clinice standard. Acest studiu a utilizat ARN izolat din țesutul tumorii mamare FFPE de la un subset de pacienți care au participat la studiul ATAC¹¹. Studiul ATAC a inclus 9.366 de pacienți în trei brațe de studiu clinic (1:1:1) în care pacienții au fost randomizați să primească 5 ani de terapie endocrină cu 1 mg de anastrozol (adică arimidex) plus un placebo pentru tamoxifen, 20 mg de tamoxifen plus un placebo de anastrozol sau o combinație de tamoxifen/arimidex. Grupul cu tratament combinat a fost întrerupt după analiza inițială, deoarece nu a prezentat beneficii de eficacitate sau tolerabilitate față de tamoxifen în monoterapie. Recent, a fost raportată o urmărire mediană de 10 ani a brațelor de monoterapie ale studiului ATAC pentru a satisface cerințele FDA pentru informații actualizate privind siguranța și eficacitatea⁹. În cazul pacienților cu receptori hormonal pozitivi, s-a înregistrat o îmbunătățire semnificativă a SFD (HR = 0,86), SFD (HR = 0,79) și SFRD (HR = 0,85) pentru acele pacienți tratate cu anastrozol în comparație cu tamoxifen în această analiză. Diferențele absolute în ceea ce privește supraviețuirea fără recidivă la distanță între anastrozol și tamoxifen au crescut în timp de la 2,7% la 5 ani la 4,3% la 10 ani. Proiectul TransATAC a fost inițiat în 2002 în cadrul protocolului TA/01 pentru a crea o bancă de țesuturi din blocuri de arhivă histopatologică FFPE de la pacienții ATAC, retrospectiv¹¹.

În total, s-au obținute 2.006 blocuri de la 4.160 de femei cu cancer de sân pozitive la receptori hormonal, care au fost repartizate aleatoriu în brațele de monoterapie din cadrul studiului ATAC. Dintre aceste blocuri FFPE, 1.372 au fost colectate de la pacienți din Regatul Unit și conțineau suficientă tumoare invazivă pentru analiză cu ajutorul testului Genomic Health® Oncotype Dx®¹². Scorul de recidivă Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) a fost determinat din blocurile FFPE, iar rezultatele studiului au validat clinic SR pentru estimarea supraviețuirii fără recurență la distanță la pacienți cu cancer de sân post-menopauză HR+, tratate cu anastrozol sau tamoxifen. ARN-ul rămas din studiul Oncotype Dx a fost trimis la Royal Marsden Hospital din Londra, unde a fost depozitat la -70 °C. Un total de 1.017 pacienți din studiul Oncotype Dx au avut >500 ng de ARN rămas și au fost testate de NanoString în cadrul studiului de validare clinică NanoString.

Acest studiu a utilizat subtipurile intrinseci generate de test și a evaluat două versiuni ale scorului ROR utilizând o abordare secvențială predefinită. Cele două scoruri ROR diferite, fiecare dintre ele variind de la 0-100, au fost calculate utilizând fie toate cele 50 de gene de test, așa cum a fost publicat anterior², fie un subset de 46 de gene. Scorul ROR este calculat folosind coeficienții unui model Cox care include corelația Pearson cu cele 50 sau 46 de gene utilizate pentru a calcula fiecare subtip intrinsec, un scor de proliferare și dimensiunea tumorii. Toate analizele au fost efectuate pe baza datelor de urmărire la 10 ani.

Criteriul final de evaluare principal a fost supraviețuirea fără recidivă la distanță (SFRD). Acesta a fost definit ca fiind intervalul de timp de la diagnostic până la recidiva la distanță sau până la decesul cauzat de cancerul mamar Criteriul final de evaluare secundar a fost supraviețuirea fără recidivă (SFR). Acesta a fost definit ca fiind intervalul de timp de la diagnostic până la prima recidivă (locală, regională sau la distanță) sau până la decesul cauzat de cancerul mamar

Utilizând toate probele de pacienți disponibile, au fost adaptate modelele multivariate de pericol proporțional Cox (PH) pentru a evalua obiectivul principal în testele secvențiale de ROR bazate pe 50 și 46 de gene. Modelul a inclus covariatele clinice standard (vârsta, stadiul tumorii, dimensiunea tumorii, statutul ganglionar, terapia adjuvantă). A fost apoi ajustat un model Cox și s-a utilizat un test de raport de probabilitate pentru a testa dacă ROR a adăugat informații prognostice suplimentare semnificative din punct de vedere statistic ($\alpha = 0,05$) în plus față de cele conținute în scorul de tratament clinic (CTS). CTS este o combinație optimizată de factori clinico-patologici dezvoltată de către investigatorul clinic ca măsură a patologiei standard¹². Analizele primare au fost repetate pentru diferite subseturi de pacienți (toți, ganglioni negativi, ganglioni pozitivi sau numai HER2 negative) și criteriul de evaluare (SFRD sau SFR).

Pentru fiecare dintre pacienții cu ganglioni negativi și cu ganglioni pozitivi, au fost utilizate modele Cox (excluzând CTS) pentru a prezice riscul de RD la 10 ani în funcție de ROR. Pe baza acestor previziuni ale modelului, au fost definite trei grupuri de risc, după cum urmează:

Risc scăzut:	<10% șanse de RD până la 10 ani
Risc intermediar:	10 - 20% șanse de RD până la 10 ani
Risc crescut:	>20% șanse de RD până la 10 ani

Analiză

Au fost generate diagrame Kaplan-Meier pentru fiecare grup de risc. Testele raportului de probabilitate (utilizate pentru a compara cele două modele statistice), așa cum au fost descrise în analiza primară, au fost efectuate pentru testul Oncotype Dx al Genomic Health (SR, scor de recurență) și testul bazat pe imunohistochimie al investigatorului principal (IHC4). Aceste rezultate au fost comparate cu cele obținute pentru ROR pentru a determina măsura în care fiecare sistem de scor oferă informații prognostice suplimentare față de CTS. Rezultatele IHC4 nu vor fi discutate în continuare, deoarece sunt dificil de comparat cu celelalte teste, deoarece testul IHC4 a fost pregătit folosind datele studiului TransATAC.

Tabelul 26: Rezumat al caracteristicilor demografice și clinice

Caracteristică	Studiu actual (n = 1.007)		Studiu inițial din care s-a obținut ARN (n = 1.231)	Brațe cu agent unic ale ATAC neincluse (n = 2.929)
	Număr de pacienți	% pacienți		
Statutul ganglionar				
Negativ	701	70%	71%	68%
Pozitiv	268	27%	25%	25%
Necunoscut	38	4%	4%	7%
Dimensiunea tumorii				
≤1 cm	138	14%	67%	70%
1–2 cm	523	52%		
2–3 cm	253	25%	33%	30%
> 3 cm	93	9%		
Stadiul tumorii				
Bine	213	21%	27%	25%
Moderat	601	60%	57%	59%
Neacceptabil	193	19%	16%	17%
Vârsta				
Medie	64,4 ani		64,3	66,1

Tabelul 27: Caracteristici clinice suplimentare

Caracteristică	Număr de pacienți	% de pacienți
Subtip		
Bazal	9	1%
HER2-îmbogățit	41	4%
Luminal A	692	69%
Luminal B	265	26%
Tratament		
Anastrozol	513	51%
Tamoxifen	494	49%
Recidive		
Oricare	210	21%
La distanță	160	16%
Statutul HER2		
Negativ	888	88%
Pozitiv	119	12%

Rezultate

Testarea analizei primare a demonstrat că scorul ROR oferă informații prognostice suplimentare pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță, în plus față de variabilele clinice standard (CTS). Toate datele ROR raportate care urmează se bazează pe 46 de gene, deoarece aceasta este baza pentru ROR, așa cum este raportată de testul Prosigna.

Tabelul 28: Testarea analizei primare a ROR

Model nul	Model alternativ	$\Delta RP \chi^2$	χ^2 valoare-p
CTS	CTS + ROR	34,21	P <0,0001

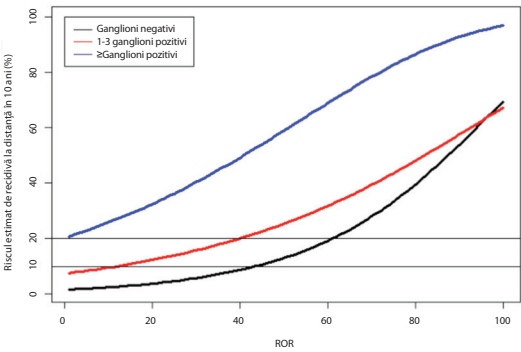
Analizele secundare au demonstrat că ROR este semnificativ legat de supraviețuirea fără recidivă la distanță și adaugă informații prognostice dincolo de CTS în mai multe subgrupuri relevante din punct de vedere clinic.

Tabelul 29: Repetarea testării analizei primare pentru subgrupuri predefinite

Grup de subiecți	Criteriu final de evaluare	Număr de pacienți	Numărul de evenimente	CTS+ROR vs. CTS	
				$\Delta RP \chi^2$	χ^2 valoare-p
Toate	SFRD	1.007	160	34,2	< 0,0001
	SFR	1.007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negativ	SFRD	888	131	28,9	< 0,0001
	SFR	888	179	26,9	< 0,0001
Ganglioni-negativi	SFRD	739	79	25,0	< 0,0001
	SFR	739	117	21,5	< 0,0001
Ganglioni pozitivi	SFRD	268	81	9,3	0,0023
	SFR	268	93	10,6	0,0011
HER2-negativ Ganglioni negativi	SFRD	649	62	24,6	< 0,0001
	SFR	649	98	20,8	< 0,0001

Analizele primare și secundare au arătat că ROR a avut o legătură continuă cu SFRD la toți pacienții și în toate subgrupurile.

Figura 22: Riscul de recidivă la distanță de zece ani preconizat estimat prin analiza scorului ROR în cadrul grupului de statut ganglionar



Analizele secundare au demonstrat că subtipurile Luminal A și Luminal B au avut rezultate semnificativ diferite din punct de vedere statistic în cadrul fiecărui subgrup de pacienți definit în funcție de statutul ganglionar.

Figura 23: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni negativi

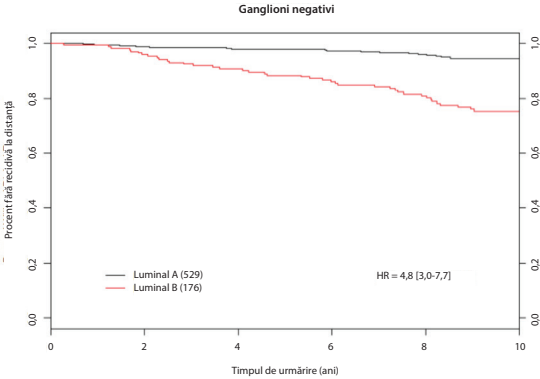
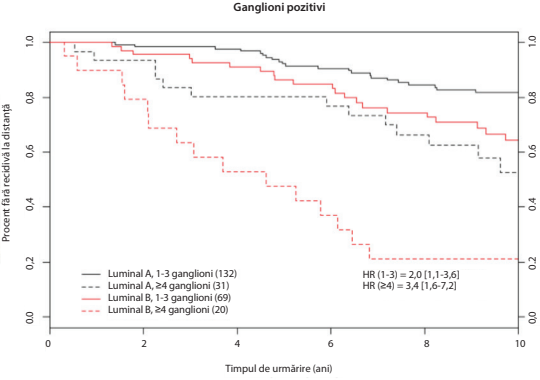
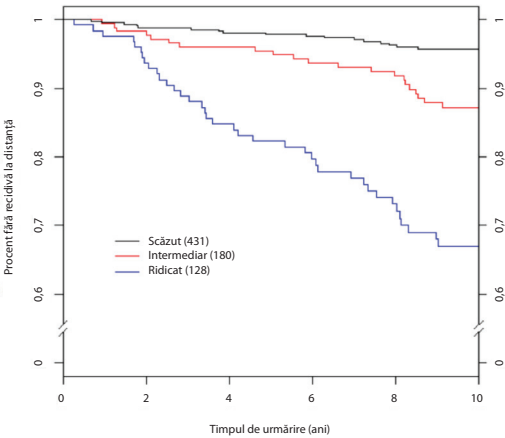


Figura 24: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni pozitivi



Figurile 25 și 26 demonstrează că, în cadrul fiecărei categorii ganglionare, riscul clinic absolut al acelor pacienți pentru care s-a preconizat un risc scăzut a fost substanțial diferit de riscul clinic absolut al pacienților pentru care s-a prezis un risc crescut: pacienții preconizați a avea un risc scăzut au avut rate de RD observate la 10 ani mai mici de 10%, în timp ce pacienții preconizați a avea un risc ridicat au avut rate de RD observate la 10 ani mai mari de 30%.

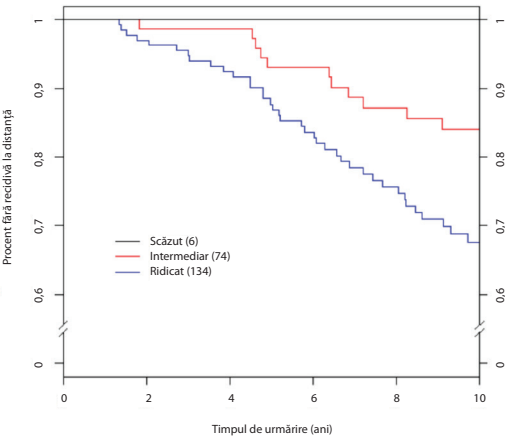
Figura 25: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi, exclusiv CTS



Rezumat al datelor pentru Figura 25: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi, exclusiv CTS

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	431 (58%)	17	96% [94% - 98%]
Intermediar	180 (24%)	22	86% [81% - 92%]
Crescut	128 (17%)	38	67% [59% - 76%]
Total	739 (100%)	77	

Figura 26: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu 1-3 ganglioni pozitivi fără CTS



Rezumat al datelor pentru Figura 26: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu 1-3 ganglioni pozitivi fără CTS

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	6 (3%)	0	100% [N/A]
Intermediar	74 (35%)	11	84% [76% - 93%]
Crescut	134 (63%)	38	68% [59% - 77%]
Total	214 (100%)	49	

Comparație între ROR și SR

Din cele 1.007 probe cu scoruri ROR, rezultatele testului Oncotype Dx au fost disponibile pentru toate cele 1.007 probe, dar rezultatele IHC au fost disponibile doar pentru 940 de probe. Pentru a permite compararea tuturor celor trei teste, rezultatele din această secțiune se bazează pe cele 940 de probe care au avut rezultate de testare pentru toate cele trei metode (cu toate acestea, IHC4 nu este raportat aici). Testele raportului de probabilitate sunt prezentate pentru adăugarea unei singure variabile, astfel încât, pentru ca informațiile adăugate să fie semnificative din punct de vedere statistic ($\alpha = 0,05$), modificarea statisticii cu 1 grad de libertate χ^2 trebuie să fie mai mare de 3,84. Figurile de mai jos arată informațiile adăugate atunci când testul de prognostic este adăugat la un alt test de prognostic plus CTS în succesiune. La fiecare adăugare, informația adăugată se măsoară prin modificarea χ^2 .

ROR adăugată la SR în plus față de CTS: informații prognostice

Figura 27: Informații prognostice pentru SFRD dincolo de CTS la toți pacienții (n = 940)

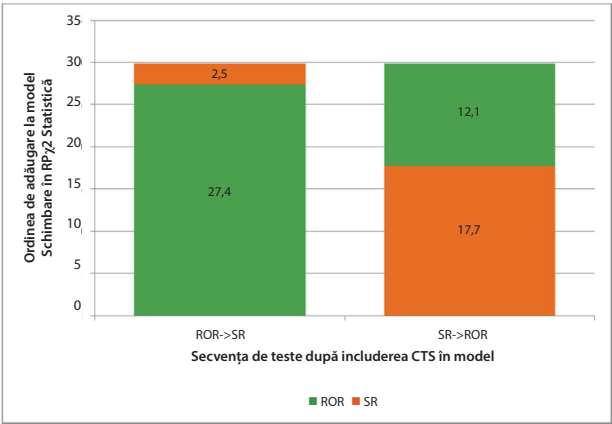


Figura 28: Informații prognostice pentru SFRD în afară de CTS la toți pacienții cu ganglioni negativi (n = 683)

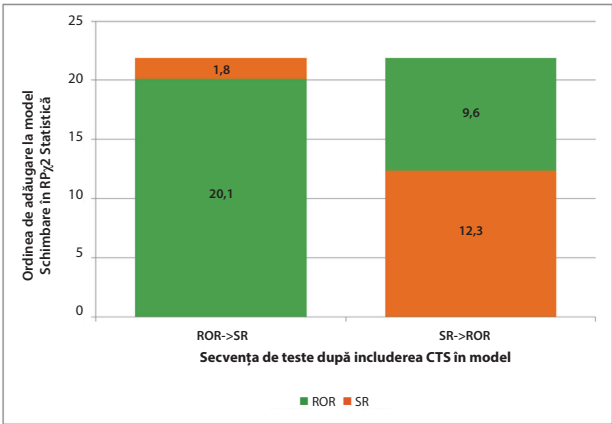


Figura 29: Informații prognostice pentru SFRD în afară de CTS la toți pacienții cu ganglioni negativi (n = 257)

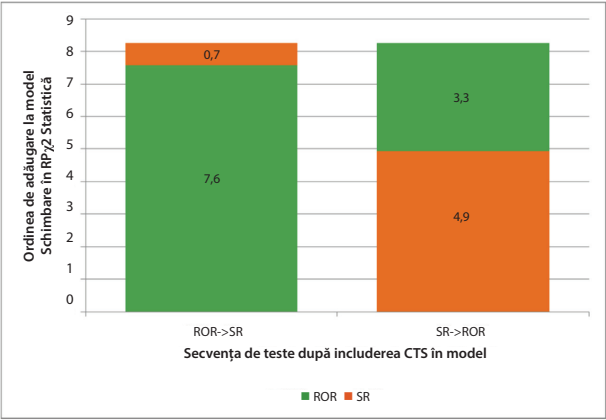
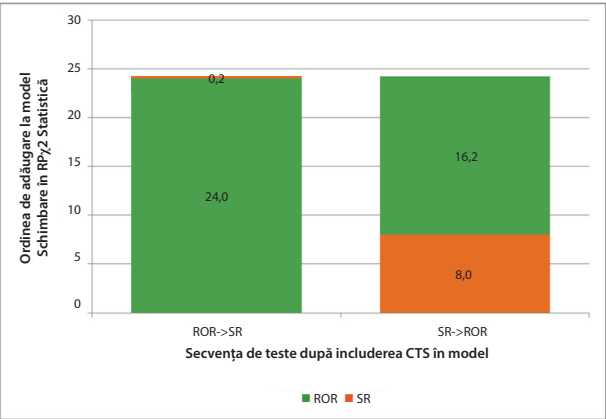


Figura 30: Informații prognostice pentru SFRD în afară de CTS la toți pacienții cu ganglioni negativi și HER2-negativi (n = 649)



Figurile 27-30 arată informațiile adăugate în plus față de CTS atunci când cele două teste de prognostic sunt adăugate succesiv. La fiecare adăugare, informația adăugată se măsoară prin modificarea statisticii χ^2 . De exemplu, atunci când ROR a fost primul test adăugat după includerea CTS (toate datele pacienților), modificarea statisticii χ^2 a fost de 27,4. Cu CTS și ROR în model, adăugarea SR a produs o schimbare în statistică χ^2 de 2,5, care nu este semnificativă (valoarea critică pentru testul χ^2 cu 1 grad de libertate este de 3,84); adică, odată ce CTS și ROR sunt ambele în model, SR nu adaugă informații semnificative. Cu toate acestea, dacă SR a fost primul test adăugat, existau încă informații conținute în ROR care nu erau incluse în combinația CTS și RS. Ambele teste prezintă semnificație de prognostic atunci când sunt adăugate la CTS la pacienții cu ganglioni pozitivi, dar niciunul dintre teste nu prezintă semnificație ca al doilea test adăugat, posibil din cauza dimensiunii mai mici a probei. Pentru subgrupul de pacienți HER2-negativi cu ganglioni negativi, SR nu adaugă informații prognostice semnificative la CTS + ROR. Pe de altă parte, ROR adaugă informații prognostice semnificative la CTS + RS.

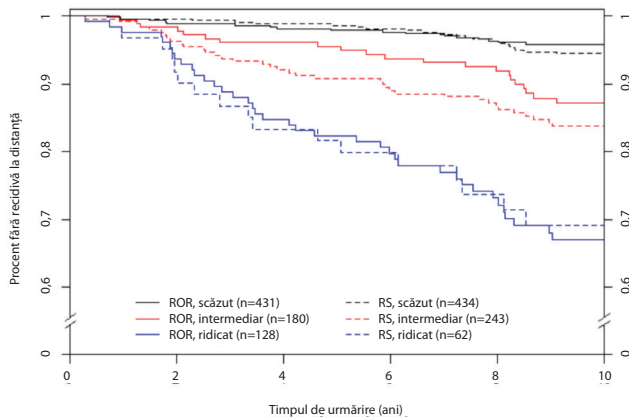
ROR vs. SR: rezultatul grupurilor de risc

Pentru a compara modul în care cele două teste au separat pacienții în funcție de risc, au fost definite grupuri de risc pe baza estimării de către fiecare test a riscului de recidivă la distanță la 10 ani în cadrul populației TransATAC. Pragurile scorului de risc pentru definirea grupurilor de risc au fost alese pentru fiecare test pe baza rezultatelor studiului nostru TransATAC, pentru a defini grupuri de risc care conțin pacienți cu același risc. Pentru a obține aceste grupuri de risc comparabile, punctele de tăiere utilizate pentru Oncotype DX au fost diferite de cele utilizate de Genomic Health. Pentru fiecare test, grupul cu risc scăzut a fost definit prospectiv ca fiind pacienții cu un risc estimat de recidivă mai mic de 10%. Pentru fiecare test, grupul cu risc intermediar a fost definit prospectiv ca fiind pacienții cu un risc estimat de recidivă între 10% și 20%. Pentru fiecare test, grupul cu risc crescut a fost definit prospectiv ca fiind pacienții cu un risc estimat de recidivă mai mare de 20%. Figura de mai jos rezumă dimensiunile și rezultatele grupurilor de risc definite de fiecare test.

Figura 31 ilustrează rezultatul conform căruia Prosigna a încadrat cu 26% mai puțini pacienți în grupul de risc intermediar decât Oncotype DX (180 de pacienți față de 243 de pacienți). În plus, Prosigna a încadrat mai mulți pacienți în grupul de risc crescut decât Oncotype DX; cu toate acestea, grupurile de risc scăzut și de risc ridicat definite de fiecare test au rezultate similare, după cum ilustrează curbele Kaplan-Meier suprapuse. Această

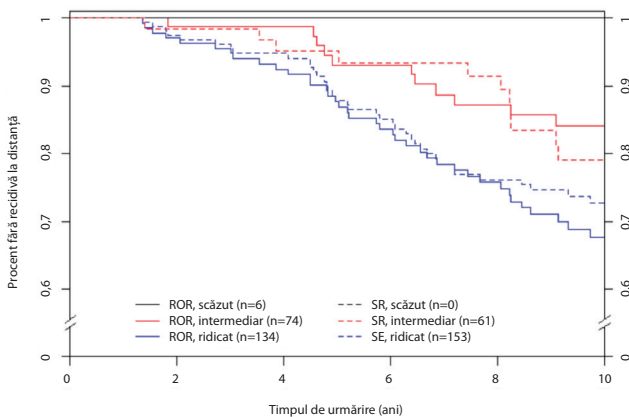
observație i-a determinat pe investigatorii independenți ai studiului nostru TransATAC să concluzioneze că Prosigna a încadrat mai puțini pacienți în grupul de risc intermediar decât Oncotype DX RS, cu o separare echivalentă sau mai mare între grupurile de risc scăzut și ridicat.

Figura 31: Scorul ROR al Prosigna a identificat mult mai mulți pacienți cu risc ridicat și mai puțini pacienți cu risc intermediar decât scorul SR al Oncotype DX pentru pacienții cu ganglioni negativi.



Atunci când s-a utilizat doar ROR la pacienții cu 1-3 ganglioni pozitivi, au existat 6 pacienți la care s-a preconizat un risc <10% de recidivă la distanță. Niciunul dintre acești pacienți nu a avut evenimente pe parcursul studiului. Unul dintre acești pacienți a fost observat timp de 7,9 ani, iar toți ceilalți nu au avut RD în cel puțin 9,9 ani de urmărire, ceea ce indică faptul că pacienții cu ganglioni pozitivi preconizați a fi cu risc scăzut au fost într-adevăr cu risc scăzut. Testele de rang logaritmice nu au fost utilizate pentru comparație, deoarece nu a existat un grup cu risc scăzut pentru SR.

Figura 32: Compararea clasificării grupelor de risc SFRD la 10 ani fără utilizarea CTS: Pacienți cu ganglioni-pozitivi (1-3 ganglioni) (ROR vs. SR)



Studiul clinic 1 Concluzii

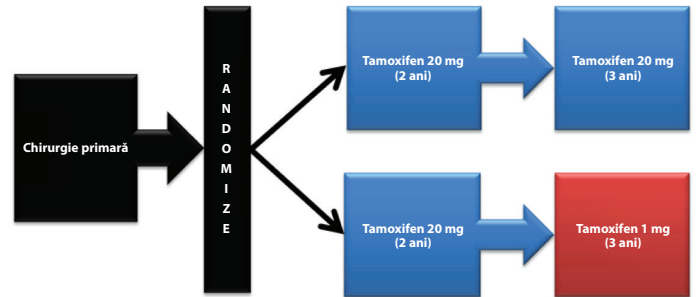
Analiza primară a indicat că ROR a adăugat informații prognostice semnificative dincolo de cele ale covariatelor clinice standard (CTS) la toți pacienții și în toate subgrupurile predefinite relevante din punct de vedere clinic. S-a demonstrat că ROR subdivizează pacienții în 3 grupe de risc, care au rezultate semnificativ diferite din punct de vedere statistic la pacienții cu ganglioni negativi. Subtipurile intrinseci Luminal A și Luminal B s-au dovedit a avea SFRD și SFR semnificativ diferite, indiferent de statutul ganglionar. În comparație cu indicatorul de prognostic SR (scor de recidivă pentru 21 de gene de la Oncotype Dx), ROR a adăugat informații prognostice în afară de SR la toți pacienții și în subgrupuri relevante din punct de vedere clinic. Mai mult, în grupul cu ganglioni negativi, ROR a dublat numărul de pacienți repartizați în grupul cu risc ridicat și a redus substanțial numărul de pacienți repartizați în grupul cu risc intermediar, fără a reduce diferențele de rezultate între grupurile cu risc scăzut și ridicat, în comparație cu SR.

Studiul 2: Prognosticul pacienților cu cancer mamar postmenopauză, pozitive la receptori hormonal, care primesc terapie endocrină sistemică adjuvantă, utilizând testul Prosigna: un studiu ABCSG-8

Structura studiului

Cohorta de studiu este formată din probe de țesut de tumori mamare FFPE colectate retrospectiv și arhivate în banca de tumori ABCSG de la pacienți înrolați între 1996 și 2004 în studiul ABCSG-8¹³. Un total de 3.901 femei aflate în postmenopauză cu cancer de sân HR+, în stadiu incipient, au fost randomizate înainte de tratament la doi ani de Tamoxifen adjuvant urmat de trei ani de Arimidex® (anastrozol) sau cinci ani de Tamoxifen adjuvant. Structura de tratament a studiului este prezentată în Figura 33.

Figura 33: Schema structurii studiului ABCSG-8



Cohorta de validare reprezintă fracțiunea din cohorta ABCSG-8 evaluabilă pentru careau putut fi colectate probe de țesut din banca de tumori ABCSG arhivate retrospectiv și pentru care s-a putut obține consimțământul exprimat în cunoștință de cauză sau pentru care pacientul a decedat. Pacienții care îndeplinesc criteriile de eligibilitate pentru studiul inițial au fost excluși fie pentru că nu erau disponibile țesuturi pentru efectuarea testului NanoString, fie pentru că pacientul nu și-a reconfirmat consimțământul. Toate probele cu un bloc tumoral și cu consimțământul pacientului au fost testate în cadrul acestui studiu.

Acest studiu a utilizat subtipurile intrinseci generate de test și a evaluat scorul ROR utilizând un plan de abordare secvențială predefinită. Scorul ROR, fiecare dintre ele variind de la 0-100, au fost calculate utilizând un subset de 46 de gene din cele 50 de gene de testare, așa cum a fost publicat anterior². Coeficienții pentru ROR au fost calculați folosind un model Cox care include corelația Pearson cu cele 46 de gene utilizate pentru a determina fiecare subtip intrinsec, un scor de proliferare și dimensiunea tumorii. Toate analizele au fost efectuate pe baza datelor de urmărire pe perioada maximă.

Criteriul final de evaluare principal a fost supraviețuirea fără recidivă la distanță (SFRD). Acesta a fost definit ca fiind intervalul de timp de la diagnostic până la recidivă la distanță sau până la decesul cauzat de cancerul mamar Criteriul final de evaluare secundar a fost supraviețuirea fără recidivă (SFR). Acesta a fost definit ca fiind intervalul de timp de la diagnostic până la prima recidivă (locală, regională sau la distanță) sau până la decesul cauzat de cancerul mamar.

Utilizând toate probele de pacienți disponibile, au fost adaptate modelele de pericol proporțional Cox (PH) pentru a evalua obiectivul principal în testele secvențiale de ROR. Modelul a inclus covariatele clinice standard (vârsta, stadiul tumorii, dimensiunea tumorii, statutul ganglionar, terapia adjuvantă). A fost apoi ajustat un model Cox și s-a utilizat un test de raport de probabilitate pentru a testa dacă ROR a adăugat informații prognostice suplimentare semnificative din punct de vedere statistic ($\alpha = 0,05$) în plus față de cele conținute în scorul de tratament clinic (CTS). CTS este o combinație optimizată de factori clinico-patologici dezvoltată de către investigatorul clinic ca măsură a patologiei standard¹². Analizele primare au fost repetate pentru diferite subgrupuri de pacienți (toți, ganglioni negativi, ganglioni pozitivi sau numai HER2 negative) și criterii de evaluare (SFRD sau SFR).

Analiză

A fost utilizată o abordare secvențială în care obiectivul științific principal a fost acela de a demonstra că ROR adaugă informații prognostice semnificative în plus față de variabilele clinice standard. Obiectivul principal a adăugat o cerință suplimentară de a demonstra că clasificarea riscului categoric în unul dintre cele trei grupuri (scăzut/intermediar/înalt) adaugă informații prognostice semnificative în plus față de variabilele clinice standard. Pentru a îndeplini această cerință, au trebuit demonstrate următoarele:

- Să arăte că scorul ROR continuu adaugă valoare prognostică peste variabilele clinice standard.
- În cazul în care ipoteza nulă a lipsei de informații prognostice este respinsă, să arate că categoriile de risc bazate pe ROR adaugă valoare prognostică în plus față de variabilele clinice standard.

Utilizând toate probele de pacienți disponibile, au fost adaptate modelele de pericol proporțional Cox (PH) pentru a evalua obiectivul principal în testele secvențiale de ROR, urmate de categoriile de risc bazate pe ROR predefinite. Modelele au inclus următoarele covariate clinice standard categorice (cu valori posibile):

- Vârsta (≥65 sau <65)
- Grad (G1 sau G2/GX)
- Dimensiunea brută a tumorii (T1, T2/T3)
- Starea ganglionară (N0, N+(1-3), N+(≥4))
- Terapie adjuvantă (Tamoxifen în monoterapie sau Tamoxifen → Anastrozol)

unde N0 reprezintă pacienții cu ganglioni negativi, N+(1-3) reprezintă pacienții cu ganglioni pozitivi cu 1-3 ganglioni pozitivi, iar N+(≥4) reprezintă pacienții cu ganglioni pozitivi cu 4 sau mai mulți ganglioni pozitivi. T1 indică tumora ≤2 cm în diametru, T2 indică o tumoare mai mare de 2 cm, dar nu mai mare de 5 cm în diametru, iar T3 indică o tumoare mai mare de 5 cm în diametru. În cadrul studiului au existat doar 14 exemplare T3, astfel încât acestea au fost combinate cu exemplarele T2. Tumorile bine diferențiate (G1) au fost comparate cu combinația de tumori lobulare moderat diferențiate (G2) și GX. În scopul analizei, tumorile lobulare GX au fost tratate ca tumori G2, deoarece tumorile G2 reprezintă cel mai frecvent grad în această populație de pacienți cu utilizare preconizată.

Aceste covariate sunt introduse în model sub forma unui scor de tratament clinic (CTS). Pentru a obține CTS, s-a aplicat următorul model:

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

În cazul în care z reprezintă variabilele clinice și de tratament enumerate mai sus, iar CTS a fost definit folosind estimările ȳobținute mai sus; adică, $CTS = \sum_j z_j \hat{\beta}_j$.

Ipoteza pericolelor proporționale a fost testată cu ajutorul valorilor reziduale Schoenfeld.

Pacienții incluși în studiul de validare au avut caracteristici similare cu cele din studiul original ACBSG-8.

Tabelul 30: Rezumat al caracteristicilor clinice

Caracteristică	Valoare	Incluși (n = 1.478)		Neincluși (n = 2.236)		Total (n = 3.714)	
		Număr	%	Număr	%	Număr	%
Tratament	Numai Tamoxifen	741	50,1%	1.108	49,3%	1.849	49,8%
	Tamoxifen → Anastrozol	737	49,9%	1.128	50,2%	1.865	50,2%
Starea RE	Negativ	14	0,9%	32	1,4%	46	1,2%
	Pozitiv	1.464	99,1%	2.199	98,3%	3.663	98,6%
	Necunoscut	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Clasa	G1	271	18,3%	468	20,8%	739	19,9%
	G2	1.152	77,9%	1.659	73,9%	2.811	75,7%
	GX	55	3,7%	109	4,9%	164	4,4%
Statutul ganglionar	N0	1.047	70,8%	1.723	76,7%	2.770	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%
Statut PgR	Negativ	260	17,6%	424	18,9%	684	18,4%
	Pozitiv	1.218	82,4%	1.805	80,4%	3.023	81,4%
	Necunoscut	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
Stadiul tumorii	T1	1.037	70,2%	1.745	77,7%	2.782	74,9%
	T2	427	28,9%	472	21,0%	899	24,2%
	T3	14	0,9%	19	0,8%	33	0,9%
Vârsta	Mediană	63		NA	64		
	Interval	41-79			41 – 80		

* Include un pacient cu >9 ganglioni pozitivi

Tabelul 31: Caracteristici clinice suplimentare

Caracteristică	Valoare	Număr de pacienți	% de pacienți
Subtip intrinsec NanoString	Luminal A	1.004	67,9%
	Luminal B	418	28,3%
	HER2-îmbogățit	48	3,2%
	Bazal	8	0,5%
Recidive	La distanță	155	10,5%
	Oricare	194	13,1%
Statutul HER2	Negativ	1.397	94,5%
	Pozitiv	77	5,2%
	Necunoscut	4	0,3%

Rezultate

Dintre cele 1.620 de probe de țesut disponibile pentru testare, 25 (1,5%) nu au trecut examenul patologic predefinit pentru o tumoare adecvată, 73 dintre cele 1.595 de probe de țesut (4,6%) cu țesut invaziv viabil nu au trecut specificațiile QC predefinite pentru ARN extras, iar 44 dintre cele 1.522 de probe de ARN (2,9%) nu au trecut specificațiile QC ale testului pentru rezultatele Prosigna, lăsând un total de 1.478 (91,2%) disponibile pentru analiză.

Dintre cele 1.478 de pacienți disponibili pentru analiză, 155 au avut recidive la distanță și 194 au avut recidive locale sau la distanță sau au decedat din cauza cancerului de sân. Durata mediană de urmărire a studiului a fost de 10 ani.

Testarea analizei primare a demonstrat că scorul ROR oferă informații prognostice suplimentare pentru supraviețuirea fără recidivă la distanță, în plus față de variabilele clinice standard (CTS).

Tabelul 32: Rezumatul testelor de analiză primară

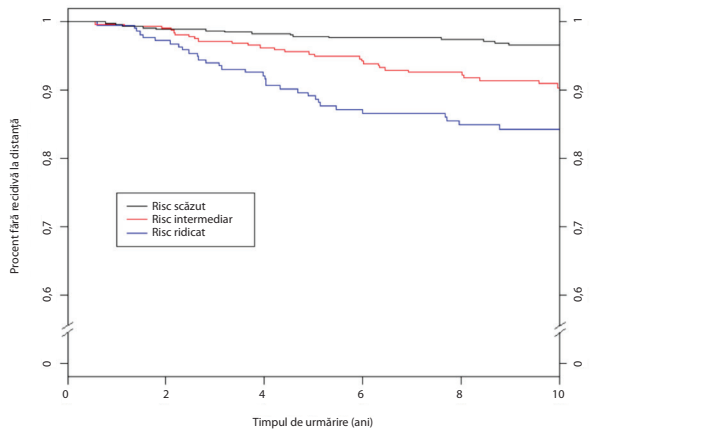
Model nul	Model alternativ	ΔRP χ²	χ² Valoare critică (grade de libertate)	χ² valoare-p
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p <0,0001
CTS	CTS + grupul de risc	34,12	5,99 (df = 2)	p <0,0001

Analizele secundare au demonstrat că ROR este semnificativ legat de supraviețuirea fără recidivă la distanță și adaugă informații prognostice dincolo de CTS în mai multe subgrupuri relevante din punct de vedere clinic.

Tabelul 33: Repetarea testării analizei primare pentru subgrupuri predefinite

Grup de subiecți	Număr de pacienți	Număr de evenimente	CTS+ROR vs. CTS	CTS + grup de risc vs. CTS
			ΔRP χ² (Valoare critică = 3,84)	ΔRP χ² (Valoare crit. = 5,99)
Toate	1.478	155	53,49	34,12
HER2-negativ	1.397	145	47,50	29,94
N0	1.047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negativ	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negativ	367	56	22,75	18,75

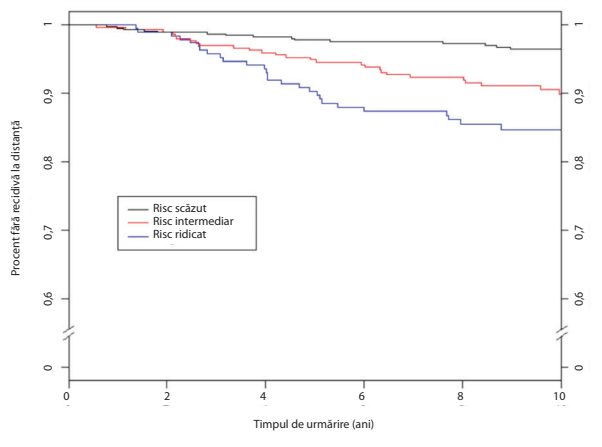
Figura 34: SFRD în funcție de grupa de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 34: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [il 95%]
Scăzut	487 (47%)	15	96,6% [94,4% - 97,9%]
Intermediar	335 (32%)	28	90,4% [86,3% - 93,3%]
Crescut	225 (21%)	32	84,3% [78,4% - 88,6%]
Total	1.047 (100%)	75	

Figura 35: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi HER2-negativi

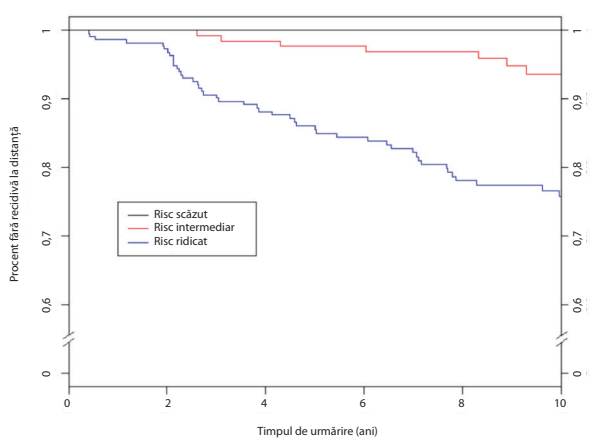


Rezumat al datelor pentru Figura 35: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi HER2-negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	474 (48%)	15	96,5% [94,3% - 97,9%]
Intermediar	311 (32%)	27	90% [85,6% - 93,1%]
Crescut	199 (20%)	27	84,7% [78,4% - 89,3%]
Total	984 (100%)	69	

Figura 36 prezintă diagramele Kaplan-Meier și de incidentă în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni negativi, iar Figura 37 prezintă aceleași diagrame pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) HER2-negativi. Rezultatele cu și fără pacienți HER2-positivi sunt similare.

Figura 36: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)

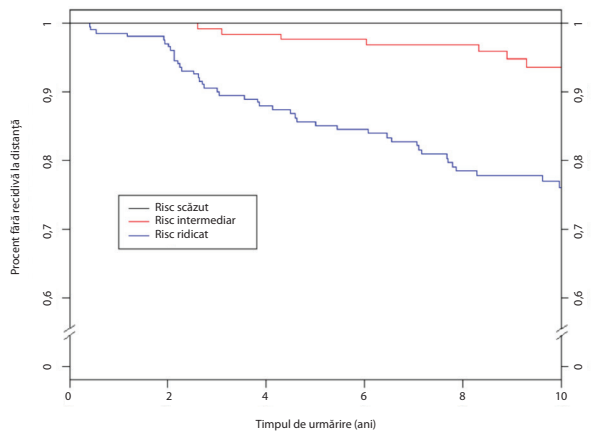


Rezumat al datelor pentru Figura 36: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)

Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Intermediar	143 (37%)	7	93,6% [86,9% - 97%]
Crescut	224 (59%)	46	75,8% [68,9% - 81,4%]
Total	382 (100%)	53	

* Intervalul de încredere estimat prin metoda Clopper-Pearson

Figura 37: SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) HER2-negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 37 SFRD în funcție de grupul de risc pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) HER2-negativi

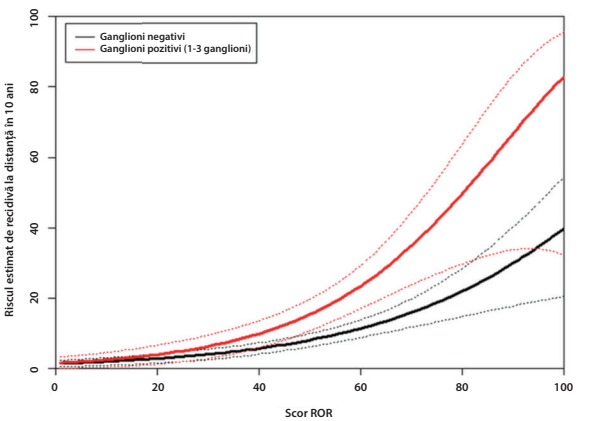
Grupul de risc	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [II 95%]
Scăzut	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Intermediar	142 (39%)	7	93,6% [86,8% - 96,9%]
Crescut	210 (57%)	43	76,1% [69,0% - 81,8%]
Total	367 (100%)	50	

* Interval de încredere estimat prin metoda Clopper-Pearson.

Relația dintre ROR și predicția riscului

Figura 38 prezintă riscul de RD la 10 ani drept o funcție a scorului ROR, cu intervale de încredere de 95%, pe baza unor modele separate de pericol proporționale Cox pentru fiecare dintre grupurile de pacienți cu ganglioni negativi și cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni pozitivi). În cazul pacienților cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni), ipoteza pericolului proporțional a fost încălcată atunci când s-a efectuat ajustarea pe întregul interval. Curba prezentată aici pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) utilizează pacienți cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) cu scoruri ROR în intervalul 0-80, pentru care a fost satisfăcută ipoteza pericolului proporțional.

Figura 38: Riscul de RD estimat la zece ani în funcție de statutul ganglionar, cu intervale de încredere de 95%



În cadrul fiecărui subgrup, riscul clinic absolut al acelor pacienți alocați grupului de risc scăzut a fost substanțial diferit de riscul clinic absolut al pacienților alocați grupului de risc crescut.

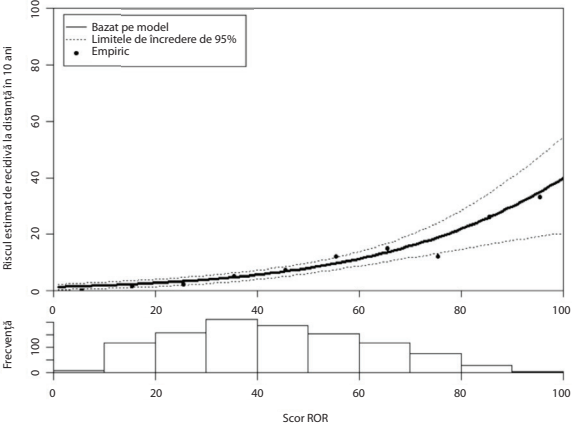
Tabelul 34 prezintă distribuția pacienților cu ganglioni negativi pe clase de 10 unități ROR. De asemenea, este prezentat și riscul de RD pe 10 ani.

Tabelul 34: Distribuția pacienților cu ganglioni negativi pe grupuri de 10 unități ROR

Interval ROR	Număr de pacienți	Procent de pacienți	Risc RD la 10 ani (empiric)
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%
Total	1.047	100%	

Figura 39 prezintă curba bazată pe modelul pentru pacienții cu ganglioni negativi împreună cu ratele de supraviețuire la 10 ani estimate empiric pentru cele 10 clase, fiecare interval fiind format din toți pacienții aflați în intervalele ROR de 10 unități (1-10, 11-20 etc.). Sub curbă se află o histogramă care arată distribuția de frecvențe în funcție de clasă.

Figura 39: Comparatie între estimările bazate pe model și cele empirice ale riscului de RD la zece ani pentru pacienții cu ganglioni negativi, cu distribuția scorurilor ROR prezentată mai jos



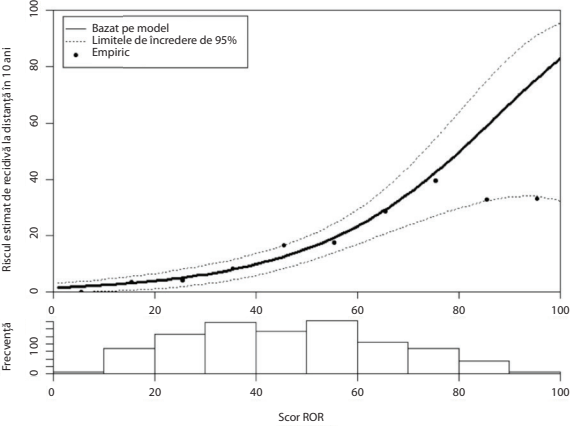
În cazul pacienților cu ganglioni negativi, estimările bazate pe modelul de pericol proporțional au fost similare cu estimările empirice pe întregul interval. Tabelul 35 prezintă distribuția pacienților cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) pe clase de 10 unități ROR. De asemenea, este prezentat și riscul de RD pe 10 ani.

Tabelul 35: Distribuția pacienților cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) pe clase de 10 unități ROR

Interval ROR	Număr de pacienți	Procent de pacienți	Risc RD la 10 ani (empiric)
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%
Total	382	100%	

Figura 40 prezintă curba bazată pe model (folosind statutul de ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) pentru pacienții cu scoruri ROR ≤80) pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) împreună cu ratele de supraviețuire la 10 ani estimate empiric pentru cele 10 clase, fiecare interval fiind format din toți pacienții aflați în intervalele ROR de 10 unități (1-10, 11-20 etc.). Sub curbă se află o histogramă care arată distribuția de frecvențe în funcție de clasă.

Figura 40: Comparatie între estimările bazate pe model și cele empirice ale riscului de RD la zece ani pentru pacienții cu ganglioni negativi (1-3 ganglioni), cu distribuția scorurilor ROR prezentată mai jos



Atât tabelul 35, cât și Figura 40 arată aplatizarea riscului observat la 10 ani în partea superioară a intervalului ROR, care a dus la eșecul ipotezei de pericol proporțional. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că dimensiunile probelor din cele două intervale de peste 80 au fost mici pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni) (17 pacienți din intervalul 81-90 și doar 3 din intervalul 91-100).

Comparatie între subtipurile intrinseci Luminal A și Luminal B

Majoritatea subiecților din studiu (96%) au fost de tip fie Luminal A, fie Luminal B, ceea ce nu a fost neașteptat, deoarece aceste subtipuri intrinseci predomină la pacienții pozitivi la receptorii hormonali¹².

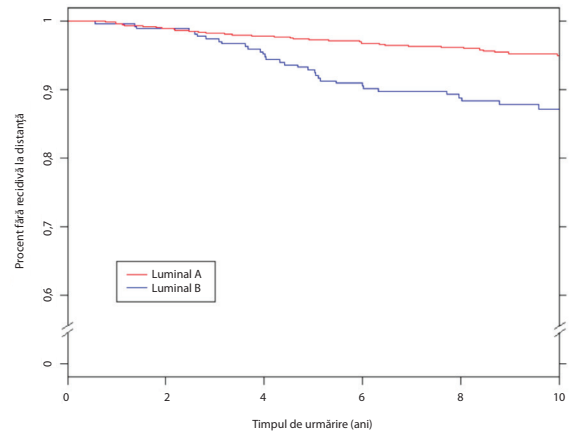
Tabelul 36 prezintă rezultatele testului raportului de probabilitate pentru a arăta valoarea prognostică suplimentară pentru SFRD pe care distincția Luminal A/Luminal B o adaugă în afară de CTS. Tabelul prezintă, de asemenea, raportul de risc care compară pacienții Luminal A cu pacienții Luminal B. A existat un risc semnificativ mai mic de recidivă la distanță pentru pacienții Luminal A în toate cele trei grupuri.

Tabelul 36. Testul raportului de probabilitate pentru valoarea prognostică SFRD a subtipurilor luminale

Subgrup	Număr de pacienți	Număr de evenimente	$\Delta RP \chi^2$	χ^2 valoare-p	Indice de risc al LumA: LumB (II 95%)
Toate	1.422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30 – 0,59]
N0	1.009	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]

Figura 41 prezintă o comparație a SFRD în funcție de subtipul Luminal pentru pacienții cu ganglioni negativi, iar Figura 42 prezintă aceeași comparație pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni). Pentru ambele grupuri, au existat diferențe semnificative între SFRD la pacienții Luminal A și Luminal B.

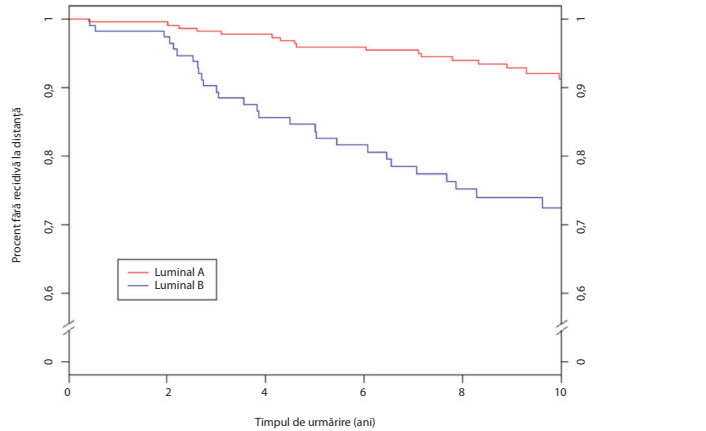
Figura 41: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni negativi



Rezumat al datelor pentru Figura 41: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni negativi

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [ÎI 95%]
Luminal A	725	32	95,1% [93,4% - 96,3%]
Luminal B	284	32	87,2% [83,2% - 90,3%]
Total	1.009	64	

Figura 42: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)



Rezumat al datelor pentru Figura 42: Curbele Kaplan-Meier pentru SFRD în funcție de subtipul intrinsec pentru pacienții cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni)

Grupul de risc	Număr de pacienți	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [ÎI 95%]
Luminal A	248	17	91,3% [87,2% - 94,2%]
Luminal B	118	28	72,5% [64,2% - 79,1%]
Total	366	45	

Tabelul 37 prezintă un tabel cu ratele SFR la 10 ani în funcție de subtipul luminal pentru grupurile cu ganglioni negativi și ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni).

Tabelul 37: Ratele SFR la zece ani în funcție de clasa ganglionară și subtipul luminal

Statut ganglionar	Subtipul luminal	Număr de pacienți (%)	Numărul de evenimente pe parcursul a 10 ani	Procentul estimat fără recidivă la distanță de 10 ani [ÎI 95%]
N0	Luminal A	725 (72)	44	93,0% [91,1% - 94,5%]
	Luminal B	284 (28)	44	82,2% [77,6% - 85,9%]
N+(1-3)	Luminal A	248 (68)	21	89,1% [84,7% - 92,4%]
	Luminal B	118 (32)	30	71,6% [62,2% - 77,4%]

Pentru fiecare dintre populațiile de pacienți cu ganglioni negativi și cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni), diferența dintre pacienții tip Luminal A și Luminal B a fost semnificativă.

Studiul clinic 2 Concluzii

S-a demonstrat că ROR a adăugat informații prognostice semnificative în plus față de variabilele clinice și de tratament standard, atât atunci când a fost inclus ca măsurătoare continuă, cât și atunci când a fost inclusă folosind trei grupuri de risc predefinite. Grupul cu risc scăzut a avut o SFRD la 10 ani cu mult peste 90%, așa cum se anticipa. Grupul cu risc ridicat a avut o SFRD la 10 ani de 80%, ceea ce a fost mai mare decât se anticipa - se preconiza să fie cu mult mai mică de 80%. Pragurile care au fost utilizate pentru a defini grupurile de risc s-au bazat pe cohorta TransATAC, care prezintă un risc mai ridicat decât cohorta actuală, ceea ce a condus la un „grup de risc ridicat” cu un risc general mai scăzut decât se anticipase. ROR (continuu și în funcție de grupul de risc) a arătat informații prognostice similare în diferite subgrupuri. Modelul de risc continuu se corelează foarte bine cu ratele empirice de recidivă atât la populațiile de pacienți cu ganglioni negativi, cât și la cele cu ganglioni pozitivi (1-3 ganglioni). Majoritatea pacienților (96%) din studiu au avut tumori de unul dintre cele două subtipuri luminal (Luminal A sau Luminal B). În toate grupurile cu statut ganglionar, distincția Luminal A/Luminal B a adăugat informații prognostice privind SFRD.

Rezumat al studiilor clinice combinate

Rezultatele sunt generalizabile pentru utilizarea distribuită, deoarece probele au fost trimise și analizate în laboratoare diferite în cele două studii de validare clinică. S-a demonstrat că ROR a adăugat informații prognostice semnificative pentru SFRD la 10 ani în plus față de variabilele clinice și de tratament standard, atât atunci când a fost inclus ca măsurătoare continuă, cât și atunci când a fost inclusă folosind trei grupuri de risc predefinite. În plus, într-o analiză post-hoc, ROR a adăugat informații semnificative pentru SFRD după 5 ani, în plus față de variabilele clinice standard pentru toți pacienții. ROR (continuu și în funcție de grupul de risc) a arătat informații prognostice similare în diferite subgrupuri. De asemenea, au fost efectuate analize limitate folosind SFR. Clasele ROR au permis, de asemenea, definirea a trei grupe de risc cu SFR distincte. Pentru ambele studii, au existat diferențe semnificative între SFRD la subgrupurile de pacienți Luminal A și Luminal B, independent de statutul ganglionar.

17 BIBLIOGRAFIE

- 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 SIMBOLURI ȘI DEFINIȚII

 - Producător

EC REP - Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

IVD - Dispozitiv medical de diagnostic *in vitro*

 - Consultați Instrucțiunile de utilizare

CE - Marcaj CE

LOT - Codul lotului/Numărul lotului

REF - Număr de catalog sau de referință

 - Conține cantitate suficientă pentru <n> teste

 - Interval de temperatură al condiții de depozitare

 - Limita inferioară de temperatură a condițiilor de depozitare

 - Limita superioară de temperatură a condițiilor de depozitare

 - Pentru utilizare până la/Data expirării

 - Cu partea aceasta în sus

Room Temp. = Temperatura camerei

HYB = Hibridizare

Declinarea responsabilității de reglementare

Pentru utilizare ca diagnosticare *in vitro*.

© 2023 Veracyte, Inc. și afiliații. Toate drepturile rezervate. Veracyte, sigla Veracyte, Prosigna și sigla Prosigna sunt mărci comerciale ale Veracyte, Inc. și ale afiliaților săi. nCounter este o marcă comercială a NanoString Technologies, Inc. și este utilizată sub licență.

19 INFORMAȚII DE CONTACT

 Informații de contact SUA:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
SUA
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com

EC REP

Reprezentant autorizat în UE:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANȚA

Date de contact la nivel global:
Adresă de e-mail asistență tehnică: DxSupport@Veracyte.com
Adresă de e-mail pentru Informații despre produs: info@prosigna.com
Site web: www.prosigna.com