veracyte®

Prosigna®
Breast Cancer Assay

Prospektüs
Prosigna® Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi

IVD CE Versiyon 02, Eylül 2023'te oluşturulmuşturr

Σ 1–10 test

Uvjeti pohrane

-20 °C -20 °C veya altında saklayın	Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi Kartuşları
-80 °C -80 °C veya altında saklayın	Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi Kod Seti
+15 °C +25 °C oda sıcaklığında saklayın	Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi Hazırlama Paketi
+2 °C +8 °C +4 °C'de saklayın	Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi Hazırlama Plakaları

İÇİNDEKİLER

1 KULLANIM AMACI ... 1
2 TEST SİSTEMİNİN ÖZETİ ... 1
2.1 nCounter Analiz Sisteminin Prensipleri ... 2
2.2 Çıktı hesaplaması için Prosigna algoritmasının prensipleri ... 2
3 SAĞLANAN REAKTİFLER VE EKİPMAN ... 2
3.1 Prosigna Kitine Genel Bakış ... 2
3.2 1, 2, 3, 4 veya 10 testlik Prosigna Kiti için Prosigna Kit İçeriği ... 3
4 UYARILAR VE ÖNLEMLER ... 3
5 GENEL TEST HUSUSLARI ... 3
5.1 Doku İşleme ... 3
5.2 Prosigna Testini Gerçekleştirme ... 4
6 EĞİTİM BİLGİLERİ ... 4
7 ATIKLARIN ELLEÇLENMESİ ... 4
8 SAKLAMA VE ELLEÇLEME (REAKTİFLER) ... 4
9 PROSIGNA İÇİN GEREKLİ ALETLER ... 4
10 GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN REAKTİFLER VE EKİPMAN ... 4
10.1 Malzemeler ... 4
10.2 Ekipman ... 4
10.3 Ekipman Özellikleri ... 5
11 NUMUNE TOPLAMA VE İŞLEME ... 5
11.1 Doku Örneği Gereklilikleri ve Patoloji İncelemesi ... 5
11.2 Numune Toplama ve Saklama ... 5
11.3 Slayt Hazırlama ... 5
11.4 Slayt İşleme ... 5
11.5 RNA izolasyonu ... 6
11.6 RNA Konsantrasyonu ve Kalitesini Ölçme ... 6
11.7 Test Prosedürü ... 6
12 SORUN GİDERME VE TEST HATALARI ... 9
13 TESTİN SONUÇLARI ... 9
13.1 İntrinsik Alt Tipler ... 9
13.2 ROR Puanı ... 10
13.3 10 Yıllık Uzak Nüks Olasılığı ... 10
13.4 Risk Sınıflandırması ... 10
13.5 Kalite Kontrol ... 10
14 PROSEDÜRLERİN SINIRLAMALARI ... 10
15 BEKLENEN DEĞERLER ... 11
15.1 Alt tipe göre ROR aralığı ... 11
15.2 Nod durumuna göre ROR skorunun sıklığı ... 11
15.3 Risk Kategorizasyonuna Göre Uzak Nüks Olmadan Sağkalım (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS) ... 11
16 PERFORMANS ÖZELLİKLERİ ... 12
16.1 Analitička preciznost i reproducibilnost ... 12
16.2 Hassasiyet / RNA girdisi ... 13
16.3 Girişim Testi ... 13
16.4 Klinik Performans ... 14
17 KAYNAKÇA ... 25
18 SEMBOLLER VE TANIMLAR ... 26
19 İLETİŞİM BİLGİLERİ ... 26

1 KULLANIM AMACI

Prosigna® Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi, bir hastanın uzak nüks riskini değerlendirmek için meme kanseri dokusunda bulunan hücrelerin gen ekspresyon profilini kullanan bir *in vitro* tanı testidir. Test, Formalin ile Sabitlenmiş, Parafine Gömülü (FFPE) meme tümörü dokusundan ekstrakte edilen RNA kullanılarak gen ekspresyon profilini ölçer. Gen ekspresyonu verileri, hastalığın uzak nüks olasılığını gösteren bir alt tip (lümen A, lümen B, HER2 zengin veya bazal benzeri) ve bir skor oluşturmak için klinik değişkenlerle birlikte ağırlıklandırılır. Test, daha önce invaziv meme karsinomu tanısı alan FFPE meme tümörü dokusu kullanılarak nCounter® Analiz Sisteminde gerçekleştirilir.

Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi, standart bakımla uyumlu bölgesel tedavi ile birlikte mastektomi veya meme koruyucu tedavi görmüş kadın meme kanseri hastalarında aşağıdakilerden biri için endikedir:

a. Diğer klinikopatolojik faktörler ile birlikte kullanıldığında, tek başına adjuvan endokrin terapisi ile tedavi edilecek Hormon Reseptör-Pozitif (HR+), lenf nodu negatif, Evre I veya II meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlarda 10 yılda uzak nüks olmaksızın sağkalım için prognostik bir gösterge.
b. Diğer klinikopatolojik faktörler ile birlikte kullanıldığında, tek başına adjuvan endokrin terapisi ile tedavi edilecek Hormon Reseptör-Pozitif (HR+), lenf nodu pozitif (1-3 pozitif nod veya 4 veya daha fazla pozitif nod), Evre II veya IIIA meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlarda 10 yılda uzak nüks olmaksızın sağkalım için prognostik bir gösterge.

2 TEST SİSTEMİNİN ÖZETİ

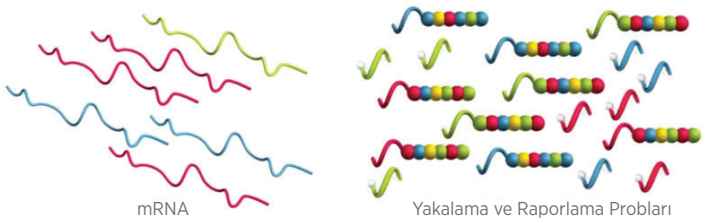
nCounter Analiz Sistemi, aşağıdaki adımları kullanarak mRNA transkriptlerinin göreli bolluğunun dijital okumaları yoluyla gen ekspresyonunun doğrudan, multipleks ölçümlerini sağlar: 1) RNA'nın floresan Raporlama ve Yakalama Problarına hibridizasyonu, 2) hibridizasyon sonrası işleme ve nCounter Hazırlama İstasyonundaki nCounter Kartuşuna sabitleme için gerekli reaktifleri içeren nCounter Hazırlama Plakaları kullanılarak hedef/ prob komplekslerinin saflaştırılması ve 3) bir test sonucu sağlamak için nCounter Dijital Analiz Cihazı üzerindeki nCounter Kartuşunun analizi1. Hem Yakalama Probları hem de Raporlama Probları, hedef hibridizasyon ve saflaştırma için benzersiz DNA prob dizileri içerir. Yakalama ve Raporlama Probları, Kod Setini oluşturmak için pozitif ve negatif kontrollerle birleştirilir. Prosigna, intrinsik alt tip sınıflandırma algoritması[2] için kullanılan 50 genin, sinyal normalizasyonu için kullanılan 8 referans genin, 6 pozitif kontrolün ve 8 negatif kontrolün ekspresyon seviyelerini, bu genlere özel olarak tasarlanmış nükleik asit problarını kullanarak tek bir hibridizasyon reaksiyonunda eşzamanlı olarak ölçer. Prosigna kitine ayrıca 58 genin her biri için *in vitro* ortamda transkripsiyona uğramış RNA hedeflerinden oluşan bir Referans Numune dâhildir. Referans Numune, çalışmayı nitelemek ve her genden gelen sinyali normalleştirmek için her hasta RNA numunesi grubu ile test edilir.

Prosigna Testi, FFPE meme tümörü dokusundan izole edilen RNA üzerinde gerçekleştirilir. Bir patolog, hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanmış bir slaytı inceler ve test için uygun invaziv meme karsinomu bölgesini tanımlar (ve işaretler). Patolog ayrıca test için gereken boyanmamış slaytların sayısını belirleyen tümör yüzey alanını ve test için yeterli tümör dokusunun mevcut olduğundan emin olmak için tümör hücreselliğini de ölçer. Eğitimli bir teknoloji uzmanı, H&E ile boyanmış slaytta işaretli tümör alanına karşılık gelen boyanmamış slaytlardaki alana makroskopik diseksiyon uygulayarak RNA'yı dokudan izole eder. İzole edilmiş RNA daha sonra, intrinsik alt tip, Nüks Riski (Risk of Recurrence, ROR) skoru ve risk kategorisi dâhil test sonuçlarını sağlamak için nCounter Analiz Sisteminde test edilir.

2.1 nCounter Analiz Sisteminin Prensipleri

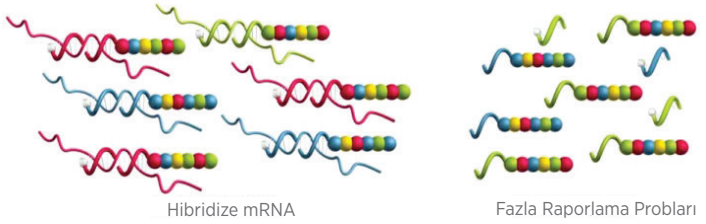
nCounter Analiz Sistemi, çözeltideki mRNA örneğine doğrudan hibridize olan gene özgü prob çiftlerini (Şekil 1) kullanır ve böylece, sonuçlarda yanlılığa neden olabilecek enzimatik reaksiyonları ortadan kaldırır. Testin ilk adımında, DNA probları, çözeltideki RNA örneğinin 70-100 baz çifti bölgesine doğrudan hibridize edilir. Floresan Raporlama Probu, mRNA hedefini tamamlayan 35-50 baz prob dizisinden ve dört floresan boyadan biri ile etiketlenmiş - kırmızı (K), sarı (S), mavi (M) veya yeşil (Y) - altı RNA segmentine hibridize benzersiz bir omurga DNA dizisinden oluşur. Floresan segmentler, her hedef için benzersiz olan altı konumlu/dört renkli bir floresan "renk kodu" oluşturur. Ayrı bir Yakalama Probu, streptavidin kaplı bir slayt üzerinde sabitleme için kullanılan biyotin ve mRNA hedefini tamamlayıcı olan 35-50 baz prob dizisinden oluşur.

Şekil 1: Kod Setinin mRNA'ya hibridizasyonu

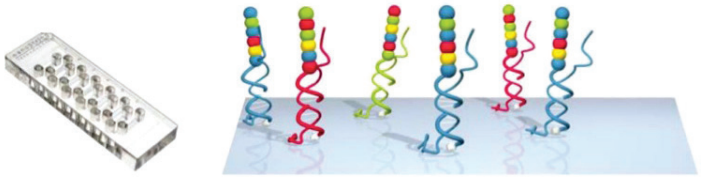


Hibridizasyondan sonra, tüm numune saflaştırma adımları nCounter Hazırlama İstasyonunda otomatikleştirilir. İlk olarak, ardışık manyetik boncuk yakalama adımları kullanılarak fazla Yakalama ve Raporlama Probları uzaklaştırılır (Şekil 2), ardından prob hedef kompleksleri bir streptavidin-biyotin bağı yoluyla nCounter Kartuşunun yüzeyindeki rastgele konumlara bağlanır (Şekil 3). Son olarak, prob/hedef kompleksleri nCounter Kartuşta hizalanır ve sabitlenir (Şekil 4).

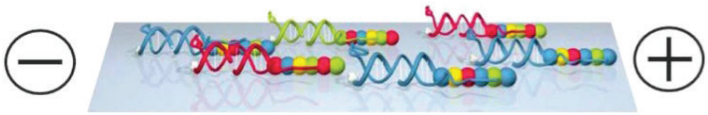
Şekil 2: Fazla Raporlama Problarının Uzaklaştırılması



Şekil 3: Hibridize Raporlama Problarının Kartuş Yüzeyine Bağlanması

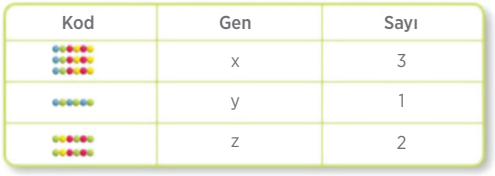


Şekil 4: Hibridize Raporlama Problarının Hizalanması ve Sabitlenmesi



Numune işleme tamamlandıktan sonra Kartuş, veri toplama için nCounter Dijital Analiz Cihazına yerleştirilir. İlgilenilen her hedef molekül, ilişkili Raporlama Probu üzerinde bulunan altı sıralı floresan nokta ile oluşturulan "renk kodu" ile tanımlanır. Kartuşun yüzeyindeki Raporlama Probları daha sonra her bir hedef molekül için sayılır, tablo haline getirilir ve algoritma ile işlenir (Şekil 5).

Şekil 5: Veri Toplama



Kod	Gen	Sayı
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Çıktı hesaplaması için Prosigna algoritmasının prensipleri

Test, orijinal olarak PAM50[2] olarak adlandırılan, rapor edilen 50 gen sınıflandırma algoritmasına dayanmaktadır ve formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) meme tümörü doku numunelerinden ekstrakte edilen RNA kullanılarak nCounter Analiz sisteminde gerçekleştirilir. Algoritma, meme kanserini dört moleküler sınıftan birine veya intrinsik alt tiplere atamak için 50 genlik ekspresyon profili kullanır: Luminal A, Luminal B, HER2 zengin veya Bazal benzeri[2]. Dört intrinsik alt tipin prototipik gen ekspresyon profilleri (ör. sentroid), Kuzey Amerika'daki birçok klinik merkezden toplanan FFPE meme tümörü numuneleri kullanılarak nCounter Analiz Sisteminde yeniden çalışılmıştır. Test bir hasta test numunesi üzerinde gerçekleştirildikten sonra, Pearson korelasyonuna dayalı bir hesaplama algoritması ile hasta test numunesinin normalleştirilmiş 50 genlik ekspresyon profili dört meme kanseri intrinsik alt tipinin prototipik ekspresyon profilleriyle karşılaştırılır. Hasta test örneğine en yüksek Pearson korelasyonuna sahip alt tip atanır.

Algoritma ayrıca, hormon reseptörü pozitif, erken evre meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlar için on yılda uzak nüks olasılığı ile ilişkili olarak 0-100 ölçeğinde[3] bir Nüks Riski (ROR) skoru bildirmektedir[4]. Rapor ayrıca bir risk kategorisi (düşük, orta veya yüksek) içerir. ROR skoru, 50 genin 46 genlik bir alt kümesinin her bir intrinsik alt tip sentroid, bir proliferasyon skoru ve gros tümör boyutu ile Pearson korelasyonunu içeren bir Cox modelinden elde edilen katsayılar kullanılarak hesaplanır. Test değişkenleri, skoru oluşturmak için Cox modelinden karşılık gelen katsayılarla çarpılır ve daha sonra FFPE meme tümörü numunelerinin deney setinden oluşturulan katsayılara dayalı olarak 0-100 ölçeğine ayarlanır. Risk kategorileri ayrıca bir klinik doğrulama çalışmasında belirlenen ROR için sınır değerlere dayalı olarak rapor edilir.

3 SAĞLANAN REAKTİFLER VE EKİPMAN

3.1 Prosigna Kitine Genel Bakış

Prosigna kiti, sipariş edilen ürüne bağlı olarak 1, 2, 3, 4 veya 10 hasta numunesini işlemek için yeterli reaktifler içerir. Sipariş bilgileri için aşağıya bakın. Prosigna kiti, piyasaya sürülmeden önce performans açısından birlikte test edilen bir Kod Seti, bir ila on testlik her set için bir Referans Numune tüpü ve sarf malzemesi bileşenleri içerir.

Katalog Numarası	Kitteki test sayısı	Dahil olan Referans Numune Tüpleri
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Veracyte FFPE RNA ekstraksiyon kiti (550100) ile birlikte kullanılması önerilir. Bu RNA ekstraksiyon kiti yalnızca Veracyte aracılığıyla sağlanır.

3.2 1, 2, 3, 4 veya 10 testlik Prosigna Kiti için Prosigna Kit İçeriği

Test sayısı	1	2	3	4	10
Prosigna Kod Seti Kutusu					
Prosigna Raporlama Probu	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL
Kod Seti	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL
Prosigna Yakalama Probu Seti	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL
Prosigna RNA Referans Örneği	1	1	1	1	1
Kod Seti Barkod Etiketi	1	1	1	1	1
Prosigna Hazırlama Plakası Kutusu					
Hazırlama Plakaları	1	1	1	1	2
Prosigna Kartuş Kutusu					
nCounter Kartuşları	1	1	1	1	1
Prosigna Hazırlama Paket Kutusu					
nCounter Hazırlama İstasyonu Uçları	1	1	1	1	1
nCounter Kartuş Yapışkan Kapağı	2	2	2	2	2
nCounter Uç Kılıfları	2	2	2	2	2
nCounter Hibridizasyon Tamponu	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
12 Kuyulu Çentikli Şerit Tüpler	4	4	4	4	4
12 Kuyulu Çentikli Şerit Tüp Kapakları	4	4	4	4	4

İçerik Açıklaması

Prosigna Kod Seti

Prosigna Raporlama Kod Seti	*tampon, floresan boyalar içeren nükleik asitler*
Prosigna Yakalama Probu Seti	*tampon, nükleik asitler*
Prosigna RNA Referans Numunesi	*tampon, nükleik asitler*
Kod Seti Barkod Etiket	*çıkartma sayfası*
Test Yapılandırma Kodu	*etiketli kart*

Prosigna Hazırlama Plakaları

Hazırlama Plakaları	*süperparamanyetik boncuklar, tampon, tuzlar, oligonükleotitler, floresan boyalar içeren polistiren boncuklar*

Prosigna Kartuşları

nCounter Kartuş(lar)	*numune kartuşu (kartuşları)*

Prosigna Hazırlama Paketi

nCounter Hibridizasyon Tamponu	*tampon, tuzlar*
12-Kuyulu Çentikli Şerit Tüpler	*plastik şeritler*
12-Kuyulu Çentikli Şerit Tüp Kapakları	*plastik kapaklar*
nCounter Hazırlama İstasyonu Uçları	*90 uçluk 2 raf + 6 nCounter delici*
nCounter Kartuş Yapışkan Kapağı	*yapışkan filmler*
nCounter Uç Kılıfları	*6-kuyuluk uç tutucular*

4 UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. *İn Vitro* Tanı Amaçlı Kullanım İçin.
2. Yerel yönetmeliklere dayalı olarak, bu testin oldukça karmaşık moleküler biyoloji tekniklerinde eğitilmiş operatörler tarafından yürütülmesi amaçlanmıştır.
3. Kit bileşenlerini Prosigna lotları arasında karıştırmayın. İşlevsellik, üretim sırasında bu şekilde nitelendirildiklerinden, sunulduğu şekilde yalnızca Prosigna kit lotları için garanti edilebilir.
4. Kalan reaktifler Prosigna Testinde yeniden kullanılmamalıdır.
5. Hibridizasyon süreleri veya sıcaklıkları ihlal edilen reaksiyonları atın.
6. Hasta numune kimliğinin doğru test sonucu ile ilişkilendirildiğinden emin olmak için numune gözetim zincirinin bütünlüğünü (dokudan RNA'ya ve RNA'dan teste) korumak önemlidir.
7. Reaktiflerin etikette belirtilen koşullar altında saklanmaması, test performansını olumsuz etkileyebilir.
8. Reaktifleri ve numuneleri tutarken daima eldiven giyin.
9. Sonuçların kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecek RNaz kontaminasyonundan kaçının.
10. Tüm biyolojik numuneler ve materyaller, bulaşıcı ajanları bulaştırma potansiyeli varmış gibi ele alınmalı ve devlet yönetmelikleri ve yerel yönetmeliklere göre uygun önlemler alınarak bertaraf edilmelidir.
11. Asla ağızdan pipetleme yapmayın.
12. Reaktifin göz, cilt ve mukoza membranlarıyla temasından kaçının.
13. Sonuç kalitesini olumsuz etkileyebilecek test numuneleri arasında veya yüksek konsantrasyonlu nükleik asit hedefleriyle (sentetik veya PCR ile güçlendirilmiş) çapraz kontaminasyonu önlemek için en iyi moleküler laboratuvar uygulamalarını kullanın.
14. Prosigna Hazırlama Plakaları ve nCounter Kartuşlarında işlem sonrası çok düşük sodyum azit seviyeleri (<%0,1) bulunduğundan, bertaraf için plastik (metal değil) atık kaplarının kullanılması önerilir. Prosigna için pek olası olmasa da, metal üzerinde sodyum azit birikiminin patlama tehlikesi oluşturduğu bilinmektedir.
15. Alete özel ek bertaraf bilgileri, Hazırlama İstasyonu ve Dijital Analiz Cihazı için nCounter Analiz Sistemi Kullanıcı Kılavuzunda ve Servis Kılavuzlarında bulunabilir.
16. Raporlama Kod Seti, Yakalama Probu Seti, Hibridizasyon Tamponu ve Hazırlama Plakaları için Malzeme Güvenlik Bilgi Formu bilgileri www.prosigna.com adresinde bulunabilir.
17. Tüm zararlı maddeler, kurumunuzun zararlı madde bertaraf yönergelerine göre atılmalıdır.
18. Kullanılmayan Kod Setleri atılmalıdır.
19. Bir hastanın tümör boyutu kategorisi yazılıma yanlış girilirse, ROR skoru ve risk sınıflandırması olumsuz etkilenebilir (ör. ROR Skorunda kayma ve/veya yanlış sınıflandırma).
20. Bir hastanın nod durumu yazılıma yanlış girilirse, hastanın test sonuçları yanlış raporlanabilir (ör. yanlış risk sınıflandırması).
21. Prosigna Testinde yetersiz kalitede veya miktarda RNA ya da yetersiz tümör yüzey alanı veya hücreselliğe sahip tümör numuneleri kullanmayın. Prosigna Testi geçerli bir sonuç veremeyip, bunun yerine test hatası bildirebilir.

5 GENEL TEST HUSUSLARI

1. Testin yalnızca cerrahi rezeksiyondan alınan formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) meme kanseri doku numunelerinde kullanılması amaçlanmıştır; taze, donmuş veya meme kanseri olmayan dokularda kullanılmak üzere tasarlanmamıştır.
2. Testi gerçekleştirmek için hastanın primer tümörünün gros boyutu ve nod durumu gereklidir.
3. İşleme sırasında reaktiflerin veya numunelerin mikrobiyal ve nükleaz kontaminasyonunu önlemek için steril tek kullanımlık mikropipet uçları kullanın.
4. Aktif olarak manipüle edilmediğinde ıslak buz üzerinde izole edilmiş RNA örneklerini koruyun.
5. Isı blokları için kalibre edilmiş termometreler gereklidir.
6. Kit bileşenlerinin hasarlı teslim edilmesi halinde bunları kullanmayın.
7. Standart laboratuvar kalite kontrol prosedürlerinin bir parçası olarak sonuçların zaman içinde doğruluğunu sağlamak için Prosigna çalıştıran laboratuvarlar tarafından klinik kontrollerin (ör. risk kategorisi için) geliştirilmesi ve kullanılması önerilir.

5.1 Doku İşleme

1. Doku işleme sırasında çevredeki tümör olmayan/normal dokunun makroskopik diseksiyonla düzgün şekilde çıkarılmaması, hekime daha düşük bir ROR skoru bildirilmesi nedeniyle riskin olduğundan az hesaplanmasına neden olabilir.
2. RNA izolasyonu sırasında insan genomik DNA'sının düzgün şekilde uzaklaştırılmaması, daha düşük test sinyaline bağlı daha yüksek başarısızlık oranıyla veya doktora bildirilen daha yüksek bir ROR skoruna bağlı olarak riskin olduğundan fazla tahmin edilmesiyle sonuçlanabilir.
3. Doku işleme sırasında ayrılmayı önlemek için tüm boyanmamış doku kesitleri pozitif yüklü mikroskop slaytlarına yüklenmelidir.
4. Birden fazla slayt gerektiren numuneler için tüm slaytlar birlikte işlenmelidir.
5. Slayta sabitlenmiş doku kesitleri, kuru bir ortamda 9 aydan daha uzun süre saklanırsa bozulabilir.
6. Kontaminasyonu önlemek için %3 gliserol çalışma solüsyonunu her hafta veya solüsyon bulanık hale gelirse değiştirin.
7. Doku kalitesinden ödün vermemek için 4 slayt setini işledikten sonra ilk D-Limonen yıkama içeriğini ve 8 slayt setini işledikten sonra Etanol (EtOH) ve ikinci D-Limonen boyama kabı içeriğini değiştirin.

8. Boyanmamış slaytta tümör alanının ana hatlarını çizerken ve tümör olmayan dokuyu çıkarırken tümör dokusunun bozulmamasına dikkat edin.
9. Makroskopik diseksiyon sırasında kesicileri dikkatli tutun.
10. İşlenen her doku örneği için yeni bir tıraş bıçağı kullanın.
11. Yeni kit lotlarını hasta testi için nitelendirmede yeni RNA izolasyon kitleri lotları/serileri izolasyon kiti spesifikasyonlarına göre test edilmelidir (ayrıntılar için bölüm 11.5'e bakın).

5.2 Prosigna Testini Gerçekleştirme

1. Hastanın kategorik primer gros tümör boyutunun yazılıma doğru girildiğinden emin olun.
2. Hastanın kategorik nod durumunun yazılıma doğru girildiğinden emin olun.
3. Hibridizasyon için gerekli ısıtmalı kapaklı ısı bloğunun spesifikasyonları karşıladığını ve rutin olarak kalibre edildiğini teyit edin.
4. Yalnızca Prosigna kitiyle sağlanan sarf malzemelerini kullanın. Bu sarf malzemeleri, nCounter Hazırlama İstasyonu ve nCounter Dijital Analiz Cihazı ile çalışmak üzere özel olarak tasarlanmıştır.
5. Hibridizasyon Tamponu düşük sıcaklıklarda saklandıysa ve bir çökelti gözlemlendiyse, tüpleri tuzlar çözünene kadar 37°C'de ısıtın.
6. Reaktiflere zarar verebileceğinden, test bileşenlerini kuvvetli bir şekilde karıştırmak için vortekslemeyin. Karıştırma, pipet kullanılarak yapılmalıdır.
7. Raporlama Kod Setini 3.000 × *g*'den yüksek bir hızda 10 saniyeden fazla santrifüj etmeyin. Santrifüj için "darbe" seçeneğini kullanmayın. Bunu yapmak Kod Setinin çökmesine neden olabilir.
8. Hazırlama İstasyonuna aktarılmaya hazır olana kadar hibridizasyon reaksiyonlarını 65°C'de koruyun. Isı bloğunun 4°C'ye düşürülmesi veya hibridizasyonun sonunda numunelerin buz üzerine yerleştirilmesi çapraz hibridizasyona neden olabilir ve bu da test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.
9. Yakalama Probu Setinin eklenmesinden sonraki 15 dakika içinde şerit tüplerin 65°C'ye yerleştirilmemesi çapraz hibridizasyona neden olabilir ve bu da test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.
10. Numunelerin 65°C'den çıkarılmasından sonraki 15 dakika içinde Hazırlama İstasyonunun işlenmesinin başlatılmaması çapraz hibridizasyona neden olabilir ve bu da test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.
11. Test sonuçlarını olumsuz etkileyebilecek buharlaşmayı önlemek için ısı bloğunda hibridizasyondan önce şerit tüp kapaklarının sıkıca kapatıldığından emin olun.

6 EĞİTİM BİLGİLERİ

Bu testin, yerel yönetmeliklere dayalı olarak, oldukça karmaşık moleküler biyoloji tekniklerinde eğitilmiş profesyonel operatörler tarafından yürütülmesi amaçlanmıştır. Prosigna Testini çalıştırmaya özel eğitim bilgileri için lütfen Veracyte ile iletişime geçin.

7 ATIKLARIN ELLEÇLENMESİ

IVD uygulamalarında kullanıma yönelik reaktiflere ve cihazlara özel atık elleçleme ayrıntıları için nCounter Analiz Sistemi Kullanıcı Kılavuzuna bakın.

Atıkların elleçlenmesi ve RNA ekstraksiyonu reaktiflerine özgü bilgiler için seçilen RNA ekstraksiyon kitinin Kullanım Talimatlarına bakın.

8 SAKLAMA VE ELLEÇLEME (REAKTİFLER)

Tüm test kiti bileşenlerinin son kullanma tarihi, Kod Seti kutusuyla birlikte verilen barkod etiketinde ve tüm Prosigna bileşenlerinin dış kutu etiketinde listelenmiştir.

- Prosigna Kod Seti kutu bileşenleri (Prosigna Raporlama Kod Seti, Prosigna Yakalama Probu Seti ve Prosigna RNA Referans Örneği) -80°C veya altında saklanmalıdır.
- nCounter Kartuşları -20°C veya altında saklanmalıdır.
- nCounter Hazırlama Plakaları 4°C'de (2–8°C) saklanmalıdır.
- nCounter Hazırlama Paketi bileşenleri 15°C–25°C oda sıcaklığında saklanmalıdır.

9 PROSIGNA İÇİN GEREKLİ ALETLER

- nCounter Analiz Sistemi (Katalog numarası NCT-SYST-DX) (aşağıdaki her iki cihazı da içerir)
  - nCounter Hazırlama İstasyonu 5s (Katalog numarası NCT- PREP-STATION-FLEX)
  - nCounter Dijital Analiz Cihazı 5s (Katalog numarası NCT- DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Ek bilgi için nCounter Analiz Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın.

10 GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN REAKTİFLER VE EKİPMAN

10.1 Malzemeler

1. FFPE RNA İzolasyon kiti (Veracyte aracılığıyla sağlanan Veracyte FFPE RNA Ekstraksiyon kiti kullanılmıyorsa izolasyon kiti gereklilikleri için bkz. Bölüm 11.5)
2. Hematoksilin ve Eozin (H&E)
3. Pozitif yüklü cam mikroskop slaytları
4. D-Limonen temizleme maddesi (histolojide kullanıma uygun)
5. %100 Etanol (Mutlak), ACS derecesi veya eşdeğeri (en az %99,5)
6. Gliserol, moleküler biyolojide kullanıma uygun
7. Nükleaz içermeyen su, moleküler biyolojide kullanıma uygun*
8. %100 izopropanol*
9. Konik tüp 50 ml
10. Tıraş Bıçağı (veya tek kullanımlık neşter)
11. Tek Kullanımlık Mikrotom Bıçakları
12. 1,5 veya 1,7 ml yapışmaz RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpleri
13. Aerosol bariyerli RNaz içermeyen Mikropipet uçları

*Veracyte FFPE RNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak yapılan RNA ekstraksiyonu için gerekli ancak sağlanmayan malzemeler.

10.2 Ekipman

1. Mikrotom
2. Su Banyosu (40°C)
3. Slayt Isıtıcı (45°C)
4. Mikroskop slaytı kurutma rafı
5. Mikropipetler; 2 µL, 20 µL, 200 µL ve 1000 µL
6. 0,2 ml şerit tüp rotorlu ve standart 1,5/2,0 ml mikrosantrifüj tüp rotorlu mini santrifüj
7. 1,5 ml santrifüj tüplerine uyan sabit açılı rotorlu standart tezgah üstü mikrosantrifüj
8. Kapaklı dikdörtgen cam boyama kapları (yaklaşık 3,6 × 2,8 × 2,4" (91 × 71 × 60 mm) iç ebat); 3 adet gerekli
9. Slayt rafı (on adede kadar 3" × 1" (75 × 25 mm) cam slayt tutar)
10. Kuru ısı bloğu, sabit*
11. Mikrosantrifüj tüpleri için tezgâh üstü vorteksleyici
12. Dereceli silindir (önerilen boyut: 100–250 ml)
13. Diseksiyon İğnesi veya kapaklı cam forseps (açılı, tırtıksız)
14. Kalibre edilmiş termometreler (55°C ila 80°C aralığını kapsar)
15. Mikro hacimli UV/Vis spektrofotometresi (aşağıdaki özelliklere bakın)
16. Isıtmalı kapaklı ısı bloğu (aşağıdaki özelliklere bakın)
17. Plaka mikroplaka adaptörlü santrifüj (aşağıdaki özelliklere bakın)
18. Coplin kavanoz

*Veracyte FFPE RNA Ekstraksiyon kiti ile RNA ekstraksiyonu için gerekli olan ekipman.

10.3 Ekipman Özellikleri

Tablo 1: Nükleik Asit Miktar Tayini için Tam Spektrum Mikro Hacimli UV/Vis spektrofotometresi

Tasarım özelliği	Özellikler
Numune Hacim Aralığı	1 – 2 µL
Yol uzunluğu	1 mm
Dalga boyu aralığı	260 – 280 nm
Dalga Boyu Doğruluğu veya Hatası	± 1 nm
Spektral Çözünürlük veya bant genişliği	En fazla 4 nm
Absorbans Hassasiyeti veya rastgele fotometrik hata	0,003 (1 mm yol)
Saptama Sınırı	5 ng/µL RNA
Maksimum Konsantrasyon	≥ 1000 ng/µL RNA

Tablo 2: Nükleik Asit Miktar Tayini için Mikro Hacimli Fotodiyot UV-Vis Spektrofotometresi

Tasarım özelliği	Özellikler
Numune Hacim Aralığı	1 – 2 µl
Yol uzunluğu	0,5 mm
Dalga boyu aralığı	260 ve 280 nm
Spektral Çözünürlük	En fazla 8 nm
Absorbans Doğruluğu	%3 (260 nm'de 1,05 Abs'de)
Saptama Sınırı	4 ng/µl RNA
Maksimum Konsantrasyon	≥ 1000 ng/µl RNA

Tablo 3: Test Hibridizasyonu için Isıtmalı Kapaklı Isı Bloğu

Tasarım özelliği	Özellikler
Isı Bloğu Tasarımı	• nCounter Hazırlama Paketi kapsamında sağlanan normal profile, 12 × 0,2 ml kilitli şerit tüplere uymalıdır. ° Düşük Profilli (LP) ve Yüksek Profilli (HP) tüpler için tasarlanmış Isı Blokları uyumlu değildir (ısı döngüleme için "hızlı" bloklar olarak da anılır) ° Diğer tüp türleri (ör. 0,1 ml tüpler, 1,5 ml tüpler) için tasarlanmış Isı Blokları uyumlu değildir • 65°C sıcaklıkta tutulacak şekilde programlanabilir olmalıdır • Sıcaklık 65°C ± 1°C aralığında tutulmalıdır
Isıtmalı Kapak Tasarımı	• Sabit veya ayarlanabilir yüksekliğe sahip kapaklar kabul edilebilir • Kapak 70°C'ye programlanabilir olmalıdır

Tablo 4: nCounter Hazırlama Plakalarını döndürmek için mikroplaka taşıyıcılı santrifüj

Tasarım özelliği	Özellikler
Santrifüjleme Hızı	En az 2000 × *g*
Rotorlar	SBS biçimli 96 kuyulu mikroplakaları yerleştirmek için mikroplaka taşıyıcılara (veya eşdeğeri) sahip 4 × 750 ml sallanan kovalı rotorlar
Modlar	Hızlanma/Yavaşlama modları

11 NUMUNE TOPLAMA VE İŞLEME

11.1 Doku Örneği Gereklilikleri ve Patoloji İncelemesi

1. Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testi, bir patolog tarafından ayrıca aşağıdaki invaziv meme karsinomu tiplerinden biriolduğu belirtilen formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) hormon reseptörü pozitif meme tümörü doku örneği üzerinde gerçekleştirilmelidir:
   a. İnvaziv duktal karsinom
   b. İnvaziv lobüler karsinom
   c. Duktal ve lobüler özelliklere sahip invaziv karsinom ("karma tip karsinom")
   d. Özel olmayan tip (NST) veya başka türlü belirtilmemiş (NOS)
2. Bir patolog, bu test için en büyük canlı invaziv meme karsinomu alanına sahip FFPE tümör bloğunu seçmelidir.
3. Test, işleme için boyanmamış slayta yüklenen doku kesitleri ve FFPE tümör bloğundan ilgili H&E ile boyanmış slayt gerektirir.
4. H&E ile boyanmış slaytta tanımlanan tümör alanının boyanmamış slaytlardaki tümör alanını temsil ettiğinden emin olmak için test işlemi için doku bölümlerinin H&E boyaması için kesilen doku bölümüne bitişik olarak kesilmesi önerilir.
5. Bir patolog, tümör olmayan çevre doku hariç, H&E ile boyanmış slayttaki canlı invaziv meme karsinomu bölgesini daire içine almalıdır.
6. Bir patolog veya eğitimli bir laboratuvar teknisyeni, H&E ile boyanmış slaytın daire içine alınmış alanı içindeki tümör hücreselliğini ve tümör yüzey alanını tahmin etmelidir.
   a. H&E ile boyanmış slayttaki tümör hücreselliği yüzdesi ≥ %10 olmalıdır
   b. H&E ile boyanmış slayttaki daire içine alınmış tümör yüzey alanı ≥ 4 mm^2 olmalıdır

   *Tümör hücresellik yüzdesinin, daire içine alınmış tümör alanı içindeki canlı tümör hücrelerinin yüzdesini ifade ettiğini unutmayın.
7. Test için girdi olarak 100 mm^2'den büyük bir toplam tümör yüzey alanı önerilir. Aşağıdaki tablo, H&E ile boyanmış slaytta ölçülen tümör yüzey alanına dayalı olarak önerilen slayt sayısını göstermektedir.
8. Doku inceleme süreci, tümör bloğunun yetersiz tümör alanına veya yetersiz tümör hücreselliğine sahip olduğunu gösterirse, aynı tümörden farklı bir blok değerlendirilebilir. Yeterli tümör dokusu içeren FFPE blokları yoksa Prosigna Testi yürütülmemelidir. Lütfen 20 mm^2'den daha az yüzey alanına sahip tümörler için RNA girdisi gerekliliklerinin karşılanmama olasılığının daha fazla olduğunu unutmayın.

Tablo 5: Tümör yüzey alanına dayalı olarak önerilen slayt gereklilikleri

H&E ile Boyanmış Slaytta Ölçülen Tümör Yüzey Alanı (mm^2)	Boyanmamış slayt sayısı
4 – 19	6
20 – 99	3
≥ 100	1

11.2 Numune Toplama ve Saklama

1. Laboratuvarın standart işletim prosedürlerine göre şunlar gerçekleştirilebilir: doku toplama ve formalin ile fiksasyonu, FFPE tümör bloğunun elleçlenmesi ve saklanması ve slayta yüklenmiş FFPE dokusunun nakliyesi.
2. Slayta yüklenen FFPE doku kesitleri, laboratuvarın standart işletim prosedürlerine göre saklanmalıdır. Daha uzun süre saklanacaksa (> 30 gün), slaytlar kuru bir ortamda saklanmalı ve test sonuçlarının kalitesinden emin olmak için 9 ay içinde işleme alınmalıdır.

11.3 Slayt Hazırlama

1. Bir mikrotom kullanarak, H&E boyaması için 4-5 µm kalınlığında bir kesit kesin.
2. Bir mikrotom kullanarak, Prosigna Testinde kullanılmak üzere 10 µm kalınlığında kesitler kesin.
3. Kesitleri 40°C'de bir su banyosunda yüzdürün.
4. Kesitleri pozitif yüklü cam mikroskop slaytlarına yükleyin.
5. Slaytları hava ile kurumaya bırakın.
6. Slaytları gece boyunca 45°C'de fırınlayın.

11.4 Slayt İşleme

1. 1,5 ml gliserol stokunu 48,5 ml moleküler uygulamada kullanıma uygun, nükleaz içermeyen su ile karıştırarak %3 gliserol çalışma solüsyonu hazırlayın; uygun şekilde ölçeklendirin. Slaytları işlemek için çözeltiyi bir Coplin kavanozuna dökün.
2. Yaklaşık 200–250 ml D-Limonen temizleme maddesini iki boyama kabına dökün ve slayt rafındaki slaytların tamamen suya batmasını sağlayın.
3. Üçüncü bir boyama kabına yaklaşık 200–250 ml mutlak Etanol (EtOH) dökün.
4. Boyanmamış slayta sabitlenmiş doku kesitlerini bir slayt rafına yerleştirin.
5. Slayt rafını ilk D-Limonen boyama kabına yerleştirin ve slayt rafını 10-15 saniye boyunca hafifçe ileri geri sallayın. Rafı toplam 2 dakika süreyle ilk D-Limonen boyama kabında bırakın.

6. Slayt rafı ilk D-Limonen boyama kabından ikinci D-Limonen kabına taşıyın. Slayt rafını 10-15 saniye boyunca hafifçe ileri geri sallayın. Slayt rafını toplam 2 dakika süreyle ikinci D-Limonen boyama kabında bırakın. Tüm parafinin uzaklaştırıldığından emin olun; aksi takdirde, rafını yaklaşık 1 dakika daha ikinci D-Limonen boyama kabında bırakın.
7. Slayt rafını ikinci D-Limonen boyama kabından EtOH banyosuna taşıyın. Slayt rafını 10-15 saniye ileri geri hafifçe çalkalayın ve 2 dakika sonra çıkarın.
8. Slaytları 5-10 dakika veya tamamen kuruyana ve doku beyaz görünene kadar kurumaya bırakın (doku boyutuna bağlı olarak bu daha uzun sürebilir).
9. Karşılık gelen H&E ile boyanmış slaytla hizalayarak ve belirtilen alanın yerini değiştirerek, boyanmamış slaytların arka tarafındaki tümör alanının ana hatlarını çizin.
10. Her seferinde bir slaytla çalışarak, ana hatları çizilen boyanmamış slayt üzerindeki dokuyu, slaytı %3 gliserol çözeltisine batırarak yeniden sulandırın.
11. Laboratuvar dokusunu içeren slayttaki fazla gliserolü uzaklaştırın.
12. Birden fazla slaytı işlerken, kullanıcı diğer slaytları yeniden sulandırırken slaytları bir kurutma rafında kurumaya bırakabilir.
13. Bir tıraş bıçağı veya neşter ile ana hatları çizilen tümör alanını çevreleyen tümör olmayan dokuları kazıyın ve atın.
14. Slaytın bir ucunu tutarak ve diğer ucunu 45 derecelik bir açıyla sağlam bir yüzeye dayayarak, makroskopik diseksiyon uygulanmış tümör dokusunu bir tıraş bıçağının kenarına toplayın. Doku toplanırken tıraş bıçağının üzerine kolayca "kıvrılmalıdır".
15. Aynı numuneden alınan her slayt için önceki adımı tekrarlayın.
    Not: Tek bir FFPE örneğinden alınan çok sayıda boyanmamış slayt, aynı tıraş bıçağı üzerinde toplanabilir.
16. Aynı numuneden doku kesitlerini etiketli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yavaşça kaydırın.
17. Kullanılmışsa, diseksiyon iğnesini veya forsepsi birkaç saniye D Limonene batırarak ve doku numuneleri arasında kurutarak temizleyin.

11.5 RNA izolasyonu

Veracyte, özellikle Prosigna ile kullanım için onaylanmış olan Veracyte FFPE RNA Ekstraksiyon kitinin kullanılmasını önerir.

Aşağıdaki özellikleri karşılayan slayta sabitlenmiş FFPE meme tümörü doku kesitlerinden RNA veriyorlarsa, Prosigna için numune hazırlamak için başka RNA izolasyon kitleri kullanılabilir:

Tablo 6: RNA İzolasyon Kiti spesifikasyonları

Ölçüler	Test veya Ölçüm	Spesifikasyon
RNA konsantrasyonu	260 nm'de Optik Yoğunluk	≥ 12,5 ng/µl
RNA toplam hacmi (µl)	Toplam elüe edilen hacim	≥ 12 µl
RNA saflığı	260 nm'deki optik yoğunluğun 280 nm'deki optik yoğunluğa oranı (OD 260/280 nm)	1,7 – 2,3
DNA Kontaminasyonu	Elüe edilmiş RNA örneğinin genomik DNA içeriği	≤ 1 ng/µl
RNA Bütünlüğü	İzole edilmiş RNA fragmanlarının boyut dağılımı	İzole edilmiş RNA fragmanlarının ≥%90'ı ≥ 100 nükleotid uzunluğunda olmalıdır

Dikkat: Prosigna testiyle birlikte bir alternative izolasyon prosedürü kullanılıyorsa bu özel iş akışı rutin olarak uygulanmadan önce laboratuvar tarafından tam olarak valide edilmelidir.

RNA İzolasyon Prosedürü:

- Veracyte FFPE RNA Ekstraksiyon kiti kullanılıyorsa Veracyte tarafından sağlanan kullanım talimatlarını izleyin.
- Bir alternative ekstraksiyon yöntemi kullanılıyorsa valide edilen protokolü veya üretici tarafından sağlanan protokolü izleyin.

Veracyte tarafından üretilen her RNA Ekstraksiyon Kiti, diagnostic gen ekspresyonu testleri için önceden tanımlanan spesifikasyonları karşılayan RNA numuneleri üretebilecek yeterliliktedir. İlgili saklama, güvenlik ve elleçleme talimatları için lütfen seçilen RNA ekstraksiyon Kitinin Yöntem Sayfasına / Kullanım Talimatlarına bakın.

11.6 RNA Konsantrasyonu ve Kalitesini Ölçme

1. Aynı iş günü içinde izole edilmiş RNA'nın konsantrasyonunu ölçün (+2 ila +8°C'de saklayın) veya kullanıma kadar -70°C veya altında dondurun.
2. 10.3 Ekipman Spesifikasyonlarında belirtilen tanımlanmış spesifikasyonları sağlayan bir spektrofotometre kullanarak izole edilmiş RNA'nın 2 µl'sinin optik yoğunluğu (OD) 260 ve 280 nm'de ölçün. Optik yoğunluk okumasını etkileyebilecek herhangi bir cam fiber kalması durumunda kaynak tüpünün altından 2 µl hacmi pipetlemekten kaçının.
3. RNA ölçümü için spektrofotometre üreticisinin talimatlarını izleyin.
4. Herhangi bir numune minimum RNA saflığı veya konsantrasyon ölçülerini karşılayamazsa (Tablo 6), numune tüpünü maksimum hızda (> 10.000 × *g*) 1 dakika santrifüjleyin, tüpü buza koyun ve ölçüm işlemini tekrarlayın. Numune, saflık veya konsantrasyon ölçümlerinden herhangi birinde başarısız olmaya devam ederse, RNA numunesi Prosigna Test prosedürü altında analiz için uygun değildir. Prosigna Testinde yetersiz kalitede veya miktarda RNA kullanmayın.
5. Minimum konsantrasyon veya minimum saflık özellikleri karşılanmazsa RNA ekstraksiyonu tekrarlanabilir (Tablo 6). Kullanıcılar, aynı FFPE bloğundan ek slaytlar izole etmeyi veya aynı hastadan ayrı bir blok seçmeyi tercih edebilir.
6. RNA konsantrasyonu 250 ng/µl'yi aşarsa, aşağı akış hibridizasyon testini gerçekleştirmeden önce moleküler alanda kullanıma uygun RNaz ve DNaz içermeyen su ile 200 ng/µl hedef konsantrasyona seyreltilmelidir. Seyreltilmiş numunenin minimum RNA saflığı 1,7'yi karşılayıp karşılamadığını belirlemek için seyreltilmemiş numuneden kaydedilen OD 260/280 oran sonucunu kullanın.
7. Prosigna Testi aynı iş günü içinde tamamlanamazsa RNA'yı -70°C veya altında dondurun.

11.7 Test Prosedürü

Bu test prosedürü, nCounter Analiz Sistemini kullanarak Prosigna Testini gerçekleştirmek için gerekli adımları açıklar. Bu adımlar birbirini izleyen iki günde aşağıdaki kategorilerde özetlenebilir:

Gün 1

- Web uygulamasında Çalışma Seti Kimliği (Run Set Identification, RSID) kaydını yapın
- Prosigna Kod Seti ile RNA hibridizasyonunun kurulumu (30 dakikalık kurulum, 15–21 saatlik hibridizasyon)

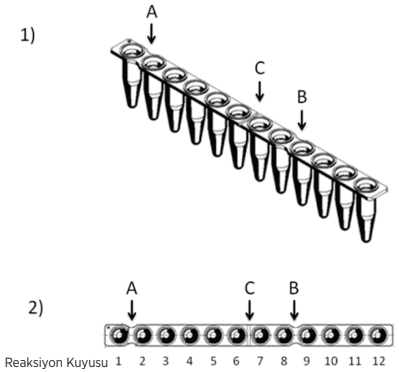
Gün 2

- Hazırlama İstasyonunun kurulumu ve çalıştırılması (20 dakikalık kurulum, yürütülen numunelerin sayısına bağlı olarak yürütme başına 2-3 saat)
- Kartuşun Dijital Analiz Cihazında kurulumu ve taranması (kurulum için 5 dakika, yürütülen numunelerin sayısına bağlı olarak her Kartuş için 2,5–4,5 saat)
- Rapor Alma (30 dakika)

Hasta Numune Seçimi ve Seri Kurulumu

1. Test çalışmasının parçası olacak hasta numunelerini belirleyin. Tek bir seriye 10 adede kadar numune dâhil edilebilir
    a. Seri içindeki her numune, cihazdaki Çalışma Seti Kimliği'nin bir parçası olarak kaydedilen ve hibridizasyon için kullanılan 12 kuyulu bir şerit tüp içinde benzersiz bir konuma atanacaktır (Çalışma Seti Kimliği web uygulaması yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilir). 1 ve 2 pozisyonlarının Referans Numune için ayrıldığını ve pozisyon 3-12'nin tümör RNA numuneleri için olduğunu unutmayın.
    b. Aşağıdaki resimde, şerit tüpün yandan 1) ve üstten 2) görünüşü gösterilmektedir. İşlem sırasında numune düzeninin korunmasına yardımcı olmak için şerit tüpler, reaksiyon kuyuları 1 ve 2 (A) ile 8 ve 9 (B) arasında asimetrik olarak kilitlenmiştir. Şerit tüpler ayrıca, standart santrifüj adaptörlerini yerleştirmek için gerekirse şerit tüpünün kesilmesini kolaylaştırmak için reaksiyon kuyuları 6 ve 7 (C) arasında çentiklidir.

Şekil 6: Kilitli şerit tüplerin çizimi



2. Seri içindeki her numune için hibridizasyon reaksiyonuna eklenecek RNA ve su (gerektiğinde) miktarını hesaplayın.
    a. Test için önerilen RNA girişi 250 ng'dir. Hibridizasyon için kabul edilebilir RNA giriş aralığı 125–500 ng'dir.
    b. İstenen numune girişini (örneğin 250 ng) ölçülen konsantrasyona bölerek hibridizasyon reaksiyonuna eklenecek RNA numunesinin hacmini (mikrolitre cinsinden) hesaplayın.
    c. Numunenin hesaplanan konsantrasyonu 12,5 ng/µl ile 25 ng/µl arasındaysa, maksimum hacim olan 10 µl'yi ekleyin.
    d. 10 µl'den az gerektiren numuneler için, 10 µl toplam numune hacmi oluşturmak için gereken su hacmini hesaplayın.

    Örnek: Ölçülen RNA konsantrasyonu 85 ng/µl olan bir numune için, toplam 250 ng kütle için 2,9 µl numune gereklidir ve kalan reaktifleri eklemeden önce hacmi 10 µl'ye getirmek için 7,1 µl su gerekir. Denklemde: 250 ng ÷ 85 ng/µl = 2,9 µl

Numune Kayıt ve İşleme

Kullanıcı, nCounter Analysis System Services web uygulamasını kullanarak her numune grubu için numune kimliklerini şerit tüp konumuyla (3–12) ilişkilendiren benzersiz bir Çalışma Seti Kimliği oluşturacaktır. Kullanıcı, nCounter Analysis System Services web uygulamasını kullanma talimatları için Kullanım Kılavuzuna başvurabilir.

1. RNA kullanımdan önce dondurulmuşsa, devam etmeden önce aşağıdaki adımları gerçekleştirin:
    a. RNA örneklerini tamamen çözdürün ve buz üzerinde saklayın.
    b. Çözülmüş numune tüpünü maksimum hızda (> 10.000 × *g*) 1 dakika santrifüjleyin ve tekrar buza koyun.
2. Test edilen hasta numunesi sayısına (1, 2, 3, 4 veya 10) göre uygun Prosigna test kiti boyutunu seçin. Çözdürmek için aşağıdaki Kod Seti kiti reaktiflerinin her birinin tüpünü –80˚C dondurucudan çıkarın. Sonraki adımlara hemen geçilmeyecekse reaktifleri buz üzerinde saklayın.
    a. Prosigna Raporlama Kod Seti (Kapakta yeşil etiket)
    b. Prosigna Yakalama Prob Seti (Kapakta gri etiket)
    c. Prosigna Referans Numune (Kapakta etiket yok)
3. Kod Seti lot barkod etiketini ve bir test yapılandırma kodunu Kod Seti kutusundan çıkarın.
4. Bir web tarayıcısı kullanarak, IVD nCounter Analiz Sistemi web uygulamasında oturum açın ve dijital kayıt formlarını kurmaya başlamak için test tipi olarak Prosigna'yı seçin.
5. Ana Sayfada "Create New Run Set - Yeni Çalışma Seti Oluştur" seçeneğini seçin.
6. Bir Prosigna çalışmasını tanımlarken ilk gerekli alan Çalışma Seti Kimliğidir. Numune serisini tanımlamak için Çalışma Seti Kimliği alanına benzersiz bir tanımlayıcı girin.
7. Test Yapılandırma Kodunu tarayın veya web uygulamasına manuel olarak girin. Bu tarandıktan veya girildikten sonra atılabilir.
8. Kod Seti Kit Numarasını tarayın veya web uygulamasına manuel olarak girin.
9. Ardından, şerit tüpün üçüncü pozisyonunda/kuyusunda bulunacak numune için benzersiz numune kimliğini karşılık gelen numune kimliği alanına girin.
    a. Bir barkod tarayıcı kullanarak veya bir klavye ile numune kimliklerini manuel olarak girerek hasta RNA Numune Kimliklerini girin.
    b. Her numune kimliğini girdikten sonra, sonraki numuneye girmeden önce numune için gerekli açılan alanları (gros tümör boyutu ve nod durumu) doldurmak için sekmeye gelin.
        i. Test için uygun nod kategorisini (sıfır, 1–3, ≥ 4) seçmek için hastanın patolojik değerlendirmesi sırasında belirlenen pozitif nod sayısını kullanın.
        ii. Test için uygun gros tümör boyutu kategorisini (≤ 2 cm veya > 2 cm) seçmek için hastanın patolojik değerlendirmesi sırasında belirlenen ölçülen gros tümör boyutunu veya evresini kullanın.
    c. Her numune için isteğe bağlı Not alanına herhangi bir yorum girilebilir.

    Not: Herhangi bir şerit tüp kuyusu/pozisyonu gerekli değilse, kalan alanları boş bırakın. Daha fazla numune için ek alanlar gerekiyorsa, daha fazla numuneyi barındıran farklı bir test konfigürasyonu kullanın.
10. Numune girişini tamamladıktan sonra, hangi kullanıcıların aşağıdakileri alacağını belirtin:
    a. Hazırlama İstasyonu ve Dijital Analiz Cihazı çalıştırmaları için durum güncellemeleri.
    b. Nihai raporun mevcut olduğuna dair bildirim.
11. Tamamlanan Çalışma Set'ini kaydedin.
    a. Çalışma Seti Çalışma Sayfası yazdırılabilir ve numune izlenebilirliği ve doğrulama amaçları için kullanılabilir.

Hibridizasyon Reaksiyon Prosedürü

Not: Aşağıdaki adımlarda on (10) hasta numunesi ve iki (2) referans numune olduğu varsayılmaktadır.

Not: Raporlama Kod Setini 3.000 × *g*'den hızlı veya 10 saniyeden fazla döndürmeyin ve döndürmek için "darbe" uygulamayın. Bunu yapmak, santrifüjün maksimum hıza ulaşmasına neden olacaktır ve Kod Setini çözeltinin dışında döndürebilir.

1. Isı bloğunu 30 µl hacim, hesaplanan blok ve kapak sıcaklığı ve "sonsuza kadar" zaman ayarını (veya eşdeğer tutma süresi ayarını) kullanarak programlayın. Isı bloğunun sıcaklığını 65°C'ye ve ısıtılmış kapağı 70°C'ye ayarlayın.

Not: Aşağıdaki adımlar için, numunelerin şerit tüpe eklendiği sırayı korumak ve Çalışma Seti Kimliğindeki sıra ile eşleştiklerinden emin olmak çok önemlidir.

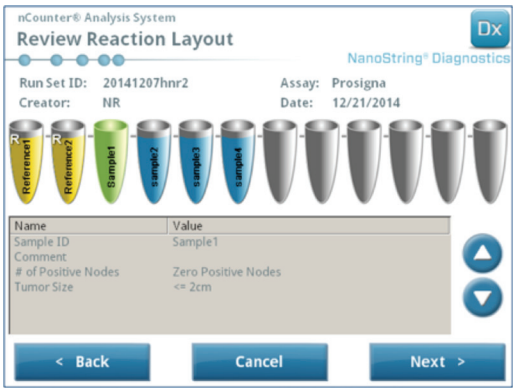
2. 1–6 konumlarını 7–12 konumlarından ayırt etmek için sağlanan kilitli 12 kuyulu şerit tüpü etiketleyin (şerit tüp resmine bakın).
3. Gerekirse, adaptörlü bir mini santrifüje sığacak şekilde şerit tüpü ikiye bölün.
4. Kilitli şerit tüpün 1 ve 2 pozisyonlarına 10 µl Referans Numuneyi pipetleyin.
5. Kilitli şerit tüpteki ilgili pozisyonlara her numune için gereken hesaplanan su hacmini pipetleyin.
6. Her numune için yeni bir pipet ucu kullanarak kilitli şerit tüpteki uygun pozisyona her numune için gereken hesaplanmış RNA hacmini pipetleyin.
7. Hasta numunesi şerit tüpe eklendikten sonra, numune tüpünün şerit tüpe eklenme sırasını koruyarak numune tüpünü bir numune tüpü rafına yerleştirmeniz önerilir. Bu, tüm numuneler şerit tüpe eklendikten sonra numunelerin amaçlanan sırayla eklendiğini doğrulamak içindir.
8. Tüm numuneler şerit tüpe eklendikten sonra, şerit tüpte numune sırasının korunduğunu doğrulayın (Numune sırasını doğrulamak için Çalışma Seti Çalışma Sayfası kullanılabilir).
    a. Gerekirse, son düzende numune sırasını yansıtmak için Web Uygulaması yazılımını kullanarak Çalışma Seti Kimliğini düzenleyin (mevcut bir Çalışma Seti Kimliğini düzenleme talimatları için nCounter Analiz Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın).
9. Numune emri doğrulandıktan sonra, tek tek RNA numune tüplerini buza geri koyun.

10. 130 µl Hibridizasyon Tamponu ve 65 µl Raporlama Kod Seti içeren bir ana karışım oluşturun.
    Not: Raporlama Kod Seti buz üzerinde saklandıysa, Hibridizasyon Tamponunu eklemeden önce 1 dakika oda sıcaklığında dengelenmesine izin verin.
11. Pipetleyerek karıştırın ve ana karışımı kısa süre döndürün.
    Not: Ana karışımı buzun üzerine koymayın.
12. 12 kuyunun her birine 15 µl ana karışım pipetleyin. Her kuyu için yeni bir pipet ucu kullanın.
    Not: Bir sonraki adımın tamamlanmasından **sonra**, şerit tüp 15 dakika içinde 65°C'de ısı bloğuna yerleştirilmelidir.
13. Her kuyu için yeni bir pipet ucu kullanarak her kuyuya 5 µl Yakalama Prob Seti ekleyin.
14. Şerit tüp kuyularını kapatın ve tam karıştırmayı sağlamak için şerit tüpünü birkaç kez ters çevirerek ve parmağınızla hafifçe vurarak reaktifleri karıştırın.
15. Şerit tüpteki numuneleri bir pikofüj veya mini santrifüjde (< 3000 × *g* 'de) kısaca döndürün.
    Not: 12 kuyulu bir şerit tüpü alabilen bir pikofüj veya gerekirse kesilmiş şerit tüpleri alabilen bir mini santrifüj kullanın.
16. Şerit tüpleri, ısıtılmış kapaklı 65°C'lik bir ısı bloğuna yerleştirin. Hibridizasyon testlerini 15–21 saat boyunca 65°C'de inkübe edin. Hibridizasyonlar, Hazırlama İstasyonunda işlenmeye hazır olana kadar 65°C'de bırakılmalıdır.
    Not: Kullanılmayan Kod Setini atın.

nCounter Hazırlama İstasyonunda Numunelerin İşlenmesi

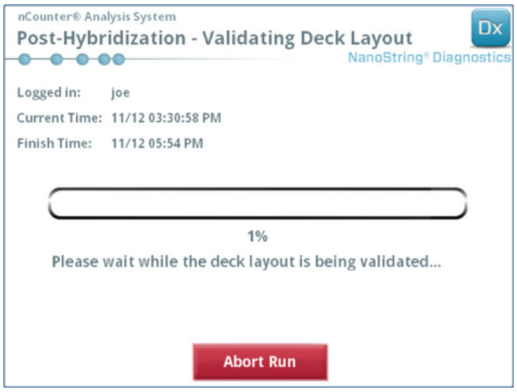
1. Dijital Analiz Cihazı ile ilişkili Hazırlama İstasyonunu bulun.
2. nCounter Kartuşu –20°C'de saklandığı yerden çıkarın ve folyo poşette 10-15 dakika oda sıcaklığında dengelenmek üzere bekletin.
   Not: Aynı kit lotundan bileşenlerin birlikte kullanıldığından emin olun.
3. Kartuş oda sıcaklığına ulaştığında, Kartuşu Hazırlama İstasyonu katına yüklemeden önce folyo poşetten çıkarın.
4. nCounter Hazırlama Plakasını/Plakalarını 4°C'de saklandıkları yerden çıkarın ve 10-15 dakika oda sıcaklığında dengelenmesini bekleyin.
   Not: 1, 2, 3 veya 4 testlik Prosigna kiti kullanılarak gerçekleştirilen işlemler için yalnızca bir Hazırlama Plakası gereklidir.
5. Hazırlama Plakalarını Hazırlama İstasyonu katına yüklemeden önce kuyuların dibindeki sıvıları toplamak için Hazırlama Plakalarını 2000 × *g*'de 2 dakika santrifüjleyin.
6. Kartuşlar ve Hazırlama Plakaları oda sıcaklığına gelirken, Hazırlama İstasyonunu nCounter Hazırlama Paketi sarf malzemeleriyle hazırlayın.
7. nCounter Hazırlama İstasyonu dokunmatik ekran arayüzünü kullanarak testiniz için "Diagnostics - Tanı" düğmesini seçin.
8. Ana Menü ekranının altında, dokunmatik ekran arayüzünde "Process Samples - Numuneleri İşleme Al" düğmesini seçin.
9. Halihazırda işlenmekte olan numunelerin RSID'sini doğrulamak için ekranda gösterilen mevcut Çalışma Seti Kimlikleri (RSID) listesine göz atın.
10. Ekrana dokunarak RSID'yi seçin ve dokunmatik ekran arayüzünde "Next - İleri" yi seçin.
11. Dokunmatik ekran arayüzünde, ekrandaki her bir tüpe bakarak ve numune bilgilerine çapraz referans yaparak uygun RSID'nin seçildiğini doğrulayın.
    a. Çalışma Seti Çalışma Sayfası, numune izlenebilirliği ve doğrulaması için burada kullanılabilir.
    b. Yanlış RSID seçilmişse, "Back - Geri" düğmesine dokunun ve doğru RSID'yi seçin.
    c. a. RSID doğruysa ancak numune girişi hataları mevcutsa, "Back - Geri" düğmesine dokunun ve bir bilgisayar iş istasyonuna gidin ve web uygulaması aracılığıyla RSID'yi düzenleyin.

Şekil 7: Hazırlama İstasyonunda bir Çalışma ekranının işlenmesi



12. Aşağıdaki birkaç ekranda, açık alanlarda istenen Reaktif Barkod Kimliklerini taramanız veya gerekli sarf malzemelerinin kat yerleşimini onaylamanız istenecektir. Her görevi gerçekleştirdikten sonra, bir sonraki komut istemine geçmek için dokunmatik ekran arayüzünde "Next - İleri" öğesini seçin.
    Not: 1, 2, 3 veya 4 testlik Prosigna kiti kullanılarak gerçekleştirilen yürütmeler için yalnızca bir Hazırlama Plakası ve bir boş ısıtıcı şerit tüpü gereklidir. 1, 2, 3 veya 4'lü test kiti yürütmeleri için Hazırlama Plakasını ve boş ısıtıcı şerit tüpü Hazırlama İstasyonu katındaki ilgili ön konumlarına (kullanıcıya en yakın) yerleştirin.
13. Numuneleri ısı bloğundan çıkarın.
    Not: Numuneleri ısı bloğundan çıkardıktan sonra 15 dakika içinde Hazırlama İstasyonu yürütme işlemini başlatın.
14. Şerit tüpü/tüpleri bir pikofüj veya mini santrifüj içine yerleştirin ve kısa süre aşağı doğru döndürün (< 3000 × *g*'de).
15. Tüp kapaklarını şerit tüplerden nazikçe çıkarın.
16. Şerit tüpteki çentikler ve Hazırlama İstasyonundaki kılavuzlar, numuneler için doğru sıra ve yönlendirmenin korunmasını sağlamalıdır.
17. Şerit tüpü/tüpleri kuyularla birlikte soldan sağa 1–12 sırasıyla nCounter Hazırlama İstasyonu katına yerleştirin. 1, 2, 3 veya 4'lü test kiti kullanılarak bir yürütme gerçekleştiriliyorsa, uygulanabilir olduğunda, şerit tüpün yalnızca ilk yarısının (kuyu 1–6) kattaki numune tüpü tutucusunun sol tarafına yerleştirilmesi gerekir. Lütfen yalnızca 1-6 kuyularının kullanılmasının önemli olduğunu unutmayın; şerit tüpün ikinci yarısı (kuyu 7-12), tüpün çentikli tasarımı nedeniyle tutucunun sol yarısına sığmayacaktır.
18. Şerit tüplerin Hazırlama İstasyonuna sıkıca oturduğundan emin olun ve metal kapağı kapatın.
19. Kapak düzgün kapanmazsa, kat düzeninin onaylanması sırasında kapağı kapatmanız istenecektir.
20. Dokunmatik ekran arayüzünde "Next - İleri" yi seçin.
21. İstendiğinde cihazın kapısını kapatın ve kat yerleşimi doğrulamasını başlatmak için "Next - İleri" yi seçin.
22. Bir hata oluşursa, kat yerleşimi doğrulamasına devam etmek için belirli hatayla ilgili talimatları izleyin.

Şekil 8: Hibridizasyon Sonrası Kat Yerleşimi Doğrulama Hazırlama İstasyonu



23. Kat düzeni doğrulandıktan sonra dokunmatik ekran arayüzünde "Start Processing - İşlemeye Başla" seçeneğini seçin.
    Not: Hazırlama İstasyonunu başlatmakta sorun yaşarsanız, hibridize edilmiş numunelerinizi ısı bloğuna geri gönderin, ancak maksimum süre olan 21 saati aşmayın.
24. Çalıştırma tamamlandığında Hazırlama İstasyonundaki istemleri izleyin.
25. Hazırlama İstasyonu çalışmayı tamamladıktan sonra, Kartuşu Hazırlama İstasyonundan dikkatlice çıkarın ve Kartuş yuvalarını sağlanan Kartuş yuvası yapışkan kapağıyla kapatın.
    Not: Kartuşun gece boyunca Hazırlama İstasyonunda açık kalmasına izin vermeyin.
26. Numuneleri aynı gün içinde taramayacaksanız, Kartuşu 4°C'de opak bir kutuda 1 haftaya kadar saklayabilirsiniz.

nCounter Dijital Analiz Cihazında Kartuşun Taranması

1. Numuneleri işleyen Hazırlama İstasyonuna bağlı Dijital Analiz Cihazını bulun. Kartuşu tarama için nCounter Dijital Analiz Cihazına yükleyin.
    a. Dijital Analiz Cihazının kapısını açın.
    b. Eklenecek Kartuşu boş bir yuvaya yerleştirin.
    c. Kapıyı kapatın ve dokunmatik ekrana bakın.
2. Dijital Analiz Cihazı dokunmatik ekran arayüzü, konum durumunu hızlı bir şekilde tanımlamaya yardımcı olmak için birkaç farklı grafiğe sahiptir:
    a. Boş Konum: Bu yuva boş olup yeni bir Kartuşun yüklenmesi için hazırdır.
    b. Tam Mavi Kartuş: Tarama tamamlanmıştır.
    AŞAĞIDAKİ KARTUŞLARI ÇIKARMAYIN:
    a. Beyaz Kartuş: Bu yuva, kayıtlı ancak taranmamış bir Kartuş içermektedir..
    b. Kısmi Mavi Kartuş: Bu yuva, tarama sürecinde olan bir Kartuş içermektedir
3. Taramayı bitiren kartuşlar Dijital Analiz Cihazından çıkarılabilir.
4. Bu, Dijital Analiz Cihazına yüklenen ilk Kartuşsa, "Diagnostics - Tanı" düğmesine dokunun, ardından Dijital Analiz Cihazında oturum açmak için "Main Menu - Ana Menü" seçeneğin seçin. Dijital Analiz Cihazı zaten Kartuşları tarıyorsa, aşağıdaki 9. adıma geçin.
5. Kartuşu Dijital Analiz Cihazı üzerindeki boş bir yuvaya (yukarıdaki konumsal durum kılavuzuna bakın) dikkatlice yerleştirin. Yuva ve Kartuş, doğru yönlendirmeyi sağlamaya yardımcı olmak için kilitlenmiştir. Barkod yukarı dönük olacaktır.
6. Yuva kapağını indirin ve Kartuşun doğru şekilde oturduğundan emin olmak için yuva kapağındaki açıklıktan Kartuşa bastırın.
7. "Start Counting - Sayımı Başlat" düğmesine dokunun ve tarayıcının tarama işlemine başlamasını bekleyin. Dijital Analiz Cihazı Kartuşu taramaya başladığında bir dizi küçük ritmik tıklama sesi duyacaksınız.
8. Ekrandaki Kartuş konumunda (taramayı başlattıktan sonraki beş dakika içinde) taramanın başladığını belirten mavi bir çubuğun göründüğünü teyit edin.
9. Halihazırda Kartuşları taramakta olan bir Dijital Analiz Cihazına Kartuş eklemek için "Counting Cartridges - Kartuşlar Sayılıyor" ekranında "Pause - Duraklat" seçeneğine dokunun ve Dijital Analiz Cihazının mevcut taramayı duraklatmasını bekleyin.
10. Dijital Analiz Cihazının kapısını açın.
11. Eklenecek Kartuşu boş bir yuvaya yerleştirin (yukarıdaki konumsal durum kılavuzuna bakın).
12. Kapıyı kapatın ve "Resume - Devam Et" seçeneğine dokunun.
13. Tarama tamamlandığında yazılım, raporu daha önce belirtilen kullanıcı e-posta adreslerine gönderir.
14. E-posta bildirimini aldıktan sonra, tamamlanmış Kartuşu çıkarın ve kurumunuzun yönergelerine göre atın.
    Not: Veri Kalite Kontrolü (KK) ile ilişkili hataların yanı sıra başarıyla tamamlanan yürütmeler için raporlar oluşturulacaktır. Veri KK ile ilişkili olmayan bir hata durumunda raporlar oluşturulmaz. Böyle bir durumda yardım için Veracyte Müşteri Hizmetleri ile iletişime geçin.
15. Bu e-postaya eklenen bağlantıyı kullanarak web uygulamasını açın ve şu anda işlenmekte olan RSID ile ilişkili tüm test raporlarını indirin.
16. Hataların Takibi: Bireysel numune veya Sistem hatası için test raporunda özetlenen tavsiyeyi izleyin.
    Not: Bireysel numune hataları Sistem hataları olarak kabul edilmez.

12 SORUN GİDERME VE TEST HATALARI

Tablo 7: Test Tekrarı Gerektiren Hata Kodları

Hata Kodu	Hata Açıklaması	Önerilen İşlem
5	Tarama Hatası	250 ng RNA ile numuneyi tekrar çalışın
7	Yüksek Sinyal	125 ng RNA ile numune yeniden tanımlanır ve test yeniden yürütülür
6	Düşük Sinyal	500 ng RNA ile numune yeniden tanımlanır ve test yeniden yürütülür
30	Düşük Sinyal	500 ng RNA ile numune yeniden tanımlanır ve test yeniden yürütülür
31	Düşük RNA Sinyali	500 ng RNA ile numune yeniden tanımlanır ve test yeniden yürütülür

Testi Tekrar Etme Nedenleri:

1. Test raporu, başarısız numuneleri belirleyecek ve hiçbir test sonucu rapor edilmeyecektir. Test sonuçları, numunelerin testi geçmesi durumunda rapor edilecektir.
2. Test raporu, test hatası durumunda hatanın türünü ve önerilen işlemi tanımlayacaktır. Başarısız numunelerin RNA konsantrasyonu yeniden ölçülebilir ve bir test sonucu elde etmek için hata tipine ve kalan RNA kütlesi miktarına bağlı olarak numuneler yeniden test edilebilir (yeni bir seri/RSID'nin parçası olarak).

13 TESTİN SONUÇLARI

Prosigna Testi, analiz sırasında her örneğe otomatik olarak uygulanan bir dizi kalite kontrol ölçümü içerir. Bu ölçüler, sonuçların beklenen değerler dahilinde olup olmadığını belirlemek için testin performansını değerlendirir. Bu kalite kontrol ölçülerinin başarılı analizi üzerine Prosigna Testi aşağıdaki sonuçları verir:

Tablo 8: Prosigna Testinin sonuçları ve çıktısı

Sonuç	Çıktı Değerleri
Meme Kanseri Numunesinin İntrinsik Alt Tipi	Luminal A, Luminal B, HER2 zengin Bazal benzeri
10 yıl içinde Uzak Nüks Olasılığının Bireysel Tahmini	%0-100
Nüks Riski (ROR) Skoru	0-100 ölçeğinde tamsayı değeri
Risk Kategorisi	Düşük, Orta, Yüksek

13.1 İntrinsik Alt Tipler

Bir meme kanseri tümörünün İntrinsik Alt Tipinin Erken Evre Meme Kanserinde prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ortalama olarak, Luminal A tümörü olan hastalar, Luminal B, HER2 zengin veya Bazal benzeri tümörleri olan hastalardan anlamlı olarak daha iyi sonuçlara sahiptir[2,5].

İntrinsik Alt Tip, bilinmeyen bir numunedeki 50 genin gen ekspresyon profili ile dört intrinsik alt tip için beklenen ekspresyon profilleri karşılaştırılarak tanımlanır. En benzer profile sahip alt tip, bilinmeyen numuneye atanır.

Meme kanserinin en sık görülen alt tipleri lümen luminal alt tiplerdir, Luminal A (LumA) ve Luminal B (LumB). Önceki çalışmalar, Luminal A'nın meme kanserlerinin yaklaşık %30 ila %40'ını ve Luminal B'nin yaklaşık %20'sini oluşturduğunu göstermektedir5. Bununla birlikte, hormon reseptörü pozitif hastaların %90'ından fazlasında luminal tümörler vardır. Bu alt tiplerin gen ekspresyon paterni, meme dokusunun lümen epitel bileşenine benzerdir[5]. Bu tümörler, yüksek östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu, progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve LIV1, GATA3 ve siklin D1 gibi ER aktivasyonu ile ilişkili genlerin yanı sıra luminal sitokeratin 8 ve 18 ekspresyonu ile karakterize edilir. Luminal A meme kanserleri Luminal B meme kanserleriyle karşılaştırıldıklarında hücre döngüsü aktivasyonu ile ilişkili genlerin daha düşük ekspresyonu sergilerler ve bu da daha iyi bir prognoz sonucuna işaret eder.

Önceki çalışmalar, HER2 zengin alt tipin (HER2-E) meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturduğunu göstermektedir[5]. Bununla birlikte, HER2 zengin tümörler genellikle ER negatiftir. Bu nedenle test edilen ER pozitif hasta popülasyonunun sadece %5'inde HER2 zengin meme kanseri olduğu bulunmuştur. ER durumundan bağımsız olarak, HER2 zengin tümörler, ERBB2 ve GRB7 dâhil olmak üzere ERBB2 kümesinin yüksek ekspresyonuna sahip vakaların çoğunda HER2-pozitiftir. Hücre döngüsü aktivasyonu ile ilişkili genler de yüksek oranda eksprese edilir.

Yayımlanmış veriler, Bazal benzeri alt tipin meme kanserlerinin yaklaşık %20 'sini oluşturduğunu göstermektedir[5]. Bununla birlikte, Bazal benzeri tümörler genellikle ER negatiftir. Bu nedenle, hormon reseptörü pozitif hastaların sadece %1'inde Bazal benzeri meme kanseri vardır. Bazal benzeri alt tip hemen hemen her zaman klinik olarak HER2 negatiftir ve bazal epitelyal sitokeratinler (CK) ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) dâhil olmak üzere bir dizi "bazal" biyobelirteci eksprese eder. Hücre döngüsü aktivasyonu ile ilişkili genler yüksek oranda eksprese edilir.

Objavljeni podaci ukazuju na to da podtip nalik bazalnom čini približno 20 % raka dojke[5]. Međutim, tumori nalik bazalnom općenito su negativni na ER, pa samo 1 % bolesnika s pozitivnim hormonskim receptorom ima tumor dojke nalik bazalnom. Podtip nalik bazalnom gotovo je uvijek klinički negativan na HER2 i eksprimira svitu "bazalnih" biomarkera uključujući citokeratine (CK) bazalnog epitela i receptor čimbenika epidermalnog rasta (EGFR). Geni povezani s aktivacijom staničnog ciklusa visoko su eksprimirani.

13.2 ROR Puanı

ROR skoru, tanımlanmış hedef popülasyon için bireysel bir hastanın 10 yıl içinde uzak nüks olasılığını ifade eden, 0-100 ölçeğinde bir tamsayı değeridir. ROR skoru, bilinmeyen bir numunedeki 46 genin ekspresyon profilini, dört farklı korelasyon değerini hesaplamak üzere yukarıda açıklandığı gibi dört intrinsik alt tip için beklenen profillerle karşılaştırarak hesaplanır. Bu korelasyon değerleri daha sonra ROR skorunu hesaplamak için bir proliferasyon skoru ve gros tümör boyutu ile birleştirilir.

13.3 10 Yıllık Uzak Nüks Olasılığı

Hormon reseptörü pozitif erken evre meme kanserli menopoz sonrası kadınlardan oluşan 2 kohort için ROR skorları, cerrahi ve 5 yıllık adjuvan endokrin tedavisi ve ardından 5 yıllık gözlemi takiben uzak nüks olmaksızın sağkalım ile karşılaştırıldı (ayrıntılar için Klinik Performans Bölüm 16.4'e bakınız). Bu iki çalışma, %95 güven aralığı dâhil olmak üzere, test edilen bu hasta popülasyonunda ROR skorunu uzak nüks olasılığı ile ilişkilendiren bir modelle sonuçlanmıştır.

13.4 Risk Sınıflandırması

Test edilen hasta popülasyonlarında klinik sonuçla ilgili kesim değerleri kullanılarak ROR skorunun yorumlanmasına izin vermek için risk sınıflandırması da sağlanır.

Tablo 9: ROR aralığı ve nod durumuna göre risk sınıflandırması

Nod Durumu	ROR Aralığı	Risk Sınıflandırması
Nod-Negatif	0–40	Düşük
	41–60	Orta
	61–100	Yüksek
Nod-Pozitif (1-3 nod)	0–15	Düşük
	16–40	Orta
	41–100	Yüksek
Nod-Pozitif (≥ 4 nod)	0–100	Yüksek

13.5 Kalite Kontrol

Prosigna Testi bileşenlerinin her lotu önceden belirlenmiş spesifikasyonlar kullanılarak test edilir. Kit düzeyindeki tüm öğeler lot olarak izlenir ve her bir kitin içerdiği kritik bileşenler birlikte test edilir ve bir Prosigna kit lotu olarak serbest bırakılır.

Prosigna Test kiti, her çalışma setinin kalitesini bir bütün olarak ve her numunenin kalitesini ayrı ayrı değerlendirmek için kullanılan bir dizi dâhili kontrol içerir. Bu kontroller aşağıda listelenmiştir.

Seri Kontrol Seti: *in vitro* ortamda transkripsiyona uğramış RNA Referans Örneği

Prosigna Test kiti içinde kontrol olarak sentetik bir RNA Referans Örneği bulunur. Referans Numune, 50 algoritmadan ve 8 referans genden *in vitro* ortamda transkripsiyonla elde edilen RNA hedeflerinden oluşur. Referans Numune, 12 reaksiyon şeridi tüpünde 10 adede kadar bilinmeyen meme tümörü RNA numunesi seti ile birlikte her Prosigna Testi çalışmasında iki kopya halinde işlenir. Referans Numuneden gelen sinyal, çalışmayı kalifiye etmek için önceden tanımlanmış eşiklere göre analiz edilir.

Meme tümörü RNA numunesinin 50 algoritma geninin her birinden gelen sinyal, Referans Numunenin karşılık gelen genlerine normalize edilir.

Pozitif Kontrol Seti: *in vitro* ortamda transkripsiyona uğratılmış RNA hedefleri ve ilgili Yakalama ve Raporlama Probları

Sentetik RNA hedefleri, Prosigna Testi için pozitif kontroller (PK'ler) olarak kullanılır. PK hedef dizileri, Harici RNA Kontrol Konsorsiyumu (ERCC) DNA dizisi kitaplığından[6] türetilir. RNA hedefleri, DNA plazmidlerinden *in vitro* ortamda kopyalanır. Altı RNA hedefi, karşılık gelen Yakalama ve Raporlama Probları ile birlikte 4 kat titrasyon serisinde (hibridizasyon reaksiyonunda 128-0.125 fM nihai konsantrasyon) test kitine dahil edilir. PK'ler, her meme tümörü RNA örneğine ve Prosigna Testiyle test edilen Referans Örneğe eklenir. PK'lerden gelen sinyal yoğunlukları önceden tanımlanmış eşikleri karşılamıyorsa, numune daha sonraki analizlere dâhil edilmez.

Negatif kontrol seti: Hedefsiz eksojen problar

Negatif kontrol hedef dizileri, ERCC DNA dizisi kitaplığından türetilir[6]. Bu hedef dizileri saptamak için tasarlanan problar, karşılık gelen hedef dizi olmadan test kitinin bir parçası olarak dâhil edilmiştir. Negatif kontroller (NK'ler) her meme tümörü RNA örneğine ve Prosigna Testiyle test edilen Referans Örneğine kalite kontrol önlemi olarak eklenir. NK'lerden gelen sinyal yoğunlukları önceden tanımlanmış eşikleri karşılamıyorsa, numune daha sonraki analizlere dâhil edilmez.

RNA Bütünlük Kontrol Seti: Referans genler

8 referans gen ve 50 algoritma genini tespit etmek için tasarlanmış Yakalama ve Raporlama Probları, Prosigna kitinin bir parçası olarak dâhil edilmiştir. Sekiz referans genin ekspresyon seviyeleri, FFPE doku örneğinden ekstrakte edilen ve Prosigna Testine girilen RNA'nın kalitesini belirlemek için analiz edilir. Referans genlerin ekspresyon seviyeleri önceden tanımlanmış eşiklerin altına düşerse, numune daha sonraki analizlere dâhil edilmez.

Referans genler, Referans Numune normalizasyonundan önce bir numunedeki bozulmamış RNA miktarındaki herhangi bir farkı normalleştirmek için de kullanılır.

14 PROSEDÜRLERİN SINIRLAMALARI

1. Prosigna Testi, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü insan meme dokusundan ekstrakte edilmiş saflaştırılmış RNA kullanılarak, bir meme kanseri tümörünün intrinsik alt tipini ve hastanın 10 yıllık uzak nüks riskini bir ROR skoru ve risk kategorisi olarak belirlemek için optimize edilmiştir. Diğer tip numuneler veya fiksatifler test edilmemiştir ve kullanılmamalıdır.
2. Prosigna Testinin performansı, yalnızca bu prospektüste sağlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerdeki değişiklikler, testin performansını değiştirebilir.
3. Prosigna Testinin performans özellikleri, 5 yıllık adjuvan endokrin tedavisi ile tedavi edilen hormon reseptörü pozitif erken evre meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlar için belirlenmiştir. Diğer tedavi rejimleriyle veya diğer hasta popülasyonlarında performans belirlenmemiştir.
4. Teste yetersiz kalitede veya miktarda RNA eklenirse, Prosigna Testi geçerli bir sonuç veremeyebilir ve bunun yerine bir test başarısızlık raporu bildirir.
5. Prosigna Testi sonuçlarının yorumlanması (intrinsik alt tip, ROR skoru, risk kategorisi) diğer klinikopatolojik faktörler, hastanın tıbbi geçmişi ve diğer laboratuvar test sonuçları bağlamında değerlendirilmelidir.
6. Prosigna Testinin performansı, yukarıdaki prosedüre göre tanımlanan özellikleri sağlayan RNA ile belirlenmiştir. Bu özellikleri karşılamayan izole edilmiş RNA ile performans belirlenmemiştir.
7. Prosigna Testini etkilediği bilinen maddeler arasında genomik DNA ve tümör olmayan doku (ör. normal doku) bulunur. Lütfen prosedüre başlamadan önce genel test hususlarına bakın. Canlı invaziv karsinom alanı, prosedürü yürütmeden önce bir patolog tarafından açıkça tanımlanmalıdır. Ek olarak, her RNA numunesine DNaz ile muamele edilmelidir. Hasta test numuneleriyle devam etmeden önce, Veracyte FFPE RNA ekstraksiyon kiti dışında bir izolasyon kiti kullanılırken her yeni DNaz lotu sağlanan özelliğe göre test edilmeli ve nitelendirilmelidir.

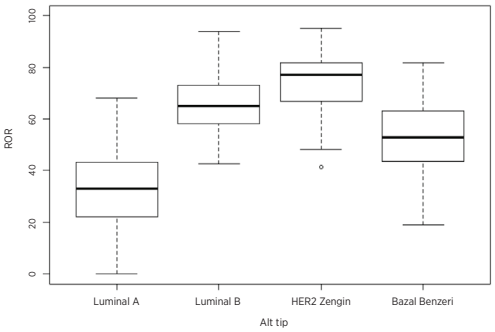
15 BEKLENEN DEĞERLER

Prosigna Testi, her tümör numunesi için bir ROR skoru (0-100), intrinsik bir alt tip (Luminal A, Luminal B, HER2 zengin veya Bazal benzeri) ve risk kategorizasyonu (Düşük, Orta veya Yüksek) bildirir. Aşağıda açıklanan iki klinik doğrulama çalışmasına dayanarak, ATAC ve ABCSG-8 çalışmalarında anastrozol veya tamoksifen ile tedavi edilen HR+, erken evre meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlarda beklenen ROR skorlarının aralığı ve sıklığı (Şekil 10), ROR'un nod durumuna göre uzak nüks olasılığı ile sürekli ilişkisi (Şekil 11) ve ROR skorlarının intrinsik alt tipe göre dağılımı (Şekil 9) gösterilmektedir. Bu klinik validasyon çalışmalarına dayalı olarak, risk kategorisine göre 10 yıllık uzak nüks olmaksızın sağkalım, Şekil 12 (Nod-Negatif hastalar) ve Şekil 13'te (Nod- Pozitif (1-3 nod) hastalar) temsil edilmektedir.

15.1 Alt tipe göre ROR aralığı

Şekil 9, İntrinsik Alt Tipe göre ROR Puanının bir kutu grafiğini göstermektedir.

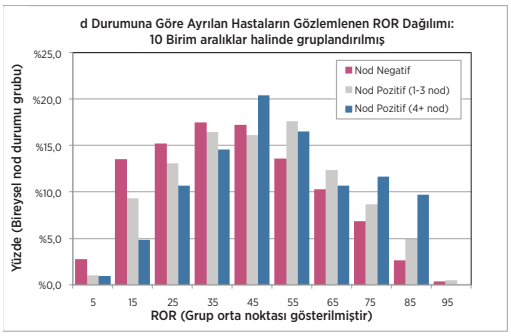
Şekil 9: İntrinsik Alt Tipe Göre ROR Puanının Kutu Grafiği



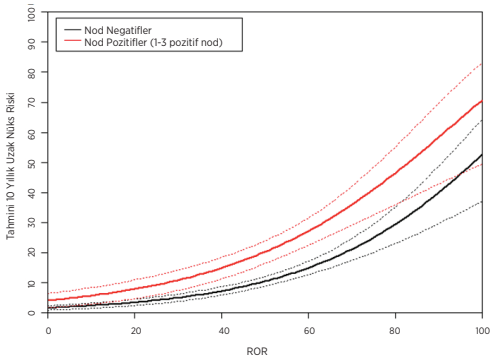
15.2 Nod durumuna göre ROR skorunun sıklığı

Şekil 10'daki histogram, üç nod tutulum grubunu ayırt etmek için ROR skorunu ve kategorik değişkenleri içeren tek bir Cox modeli kullanılarak oluşturulmuştur.

Şekil 10: ROR skoru ve nod durumu gruplarının histogramı



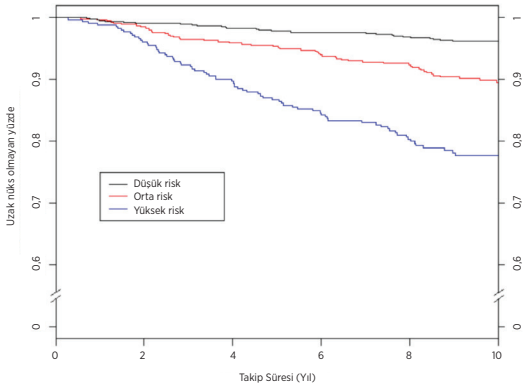
Şekil 11: Nod Durumu Grubunda Tahmin Edilen On Yıllık Öngörülen Risk



15.3 Risk Kategorizasyonuna Göre Uzak Nüks Olmadan Sağkalım (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS)

Aşağıdaki veriler, TransATAC ve ABCSG-8 çalışmalarının birleşik analizinden elde edilmiştir. Hastaları risk gruplarına tahsis etmek için, ROR skorları, nod negatif veya nod pozitif hastalar için önceden tanımlanmış risk eşikleriyle karşılaştırılmıştır. Şekil 12 ve 13'te, nod durumuna göre her bir risk kategorisi grubu için 10 yıllık uzak nüks olmaksızın sağkalım gösterilmektedir.

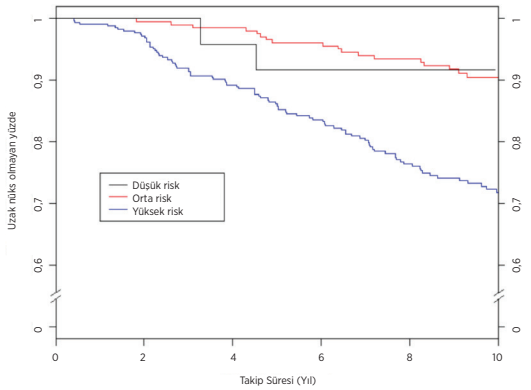
Şekil 12: Nod Negatif Hastalar için Risk Grubuna Göre DRFS



Şekil 12 için Veri Özeti: Nod Negatif Hastalar için Risk Grubuna Göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Olay Sayısı	10 yılda Uzak Nüks Göstermeyen Tahmini Yüzde [%95 GA]
Düşük	875 (%49)	31	%96,2 [%94,7 - %97,3]
Orta	551 (%31)	53	%89,2 [%86,1 - %91,7]
Yüksek	360 (%20)	73	%77,7 [%72.8 - %81,9]
Toplam	*1.786 (%100)*	*157*	

Şekil 13: Nod Pozitif (1-3 nod) Hastalar için Risk Grubuna Göre DRFS



Şekil 13 için Veri Özeti: Nod Pozitif (1-3 nod) Hastalar için Risk Grubuna Göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Olay Sayısı	10 yılda Uzak Nüks Göstermeyen Tahmini Yüzde [%95 GA]
Düşük	24 (%4)	2	%91,7 [%70,6 - %97,8]
Orta	211 (%36)	18	%90,4 [%85,2 - %93,9]
Yüksek	355 (%60)	87	%71,8 [%66,3 - %76,6]
Toplam	*590 (%100)*	*107*	

Tablo 10: 4 veya daha fazla pozitif nodu olan hastalar için on yıllık DRFS oranları

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Olay Sayısı	10 yılda Uzak Nüks Göstermeyen Tahmini Yüzde [%95 GA]
Yüksek	103	39	%57,4 [%46,3 - %67,0]

16 PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

16.1 Analitička preciznost i reproducibilnost

Prosigna'nın genel kesinliğini ve tekrarlanabilirliğini tahmin etmek için iki çalışma yürütülmüş ve sonuçlar birleştirilmiştir. Yapılan ilk çalışma, ekstrakte edilmiş meme tümörü RNA'sından başlayan nCounter Analiz Sistemi üzerine bir kesinlik çalışması ve ikinci çalışma, pre-analitik faktörleri içeren FFPE meme tümörü dokusundan başlayan bir tekrarlanabilirlik çalışmasıdır.

RNA Kesinliği

16.1.1 Çalışma Tasarımı

Analitik kesinliği değerlendirmek için nCounter Analiz Sisteminde Prosigna Test ile üç merkezde kör ve randomize karşılaştırmalı bir çalışma yapılmıştır. Arşivlenmiş FFPE numunelerinden her bir merkezde test edilmek üzere beş havuzlanmış meme tümörü RNA örneği üretilmiştir. Numune paneli, rutin testler sırasında karşılaşılan prototipik gen ekspresyon profillerini ve her bir risk sınıflandırma grubunu temsil etmiştir.

Her merkezde, her bir operatör tarafından yapılan bir alıştırma uygulamasının ardından 18 geçerli çalıştırma (her operatör tarafından yapılan, her biri 10 testten oluşan 9 çalıştırma) tamamlanmıştır (Tablo 11). Her bir numune, her çalıştırma sırasında test için 250 ng nominal RNA girdi seviyesinde iki kez test edilmiştir. Her operatör, uzun çalıştırma yöntemleri[7] için genel kabul görmüş standarda göre belirli bir günde bir çalıştırmayı tamamlamıştır. Alıştırma dahil toplam çalıştırma süresi, her bir merkezde 4 haftadan uzun sürmüştür.

Tablo 11: RNA Kesinlik Çalışmasına Genel Bakış

Çalışma Değişkeni	Sayılar
Meme tümörü RNA örnekleri sayısı	5
Çalıştırma (aynı Kartuş) başına numune kopya sayısı	2
Çalıştırma sayısı/Merkez	18
Çalıştırma sayısı/gün	1
Operatör sayısı/Merkez	2
Reaktif lot sayısı/Merkez	3
Merkez sayısı	3
Merkez başına test edilen toplam örnek sayısı (alıştırma hariç)=	*180*
Toplam örnek sayısı =	*540*

16.1.2 Varyans Bileşenleri Analizi

Tablo 12, her bir panel üyesi için varyans bileşenleri analizinden elde edilen çıktıyı göstermektedir. Tahmini varyansın altında toplam varyansın yüzdesi bulunur (parantez içinde).

Tablo 12: Panel Üyesine göre Varyans Bileşenleri (havuzlanmış RNA örneği)

Riske, Alt Tipe göre Panel Üyesi	Ortalama ROR	Varyans Bileşeni					Toplam Varyans	Toplam SS
		Lot	Merkez	Operatör	Çalıştırma	Çalıştırma içi		
Düşük Luminal A	31,4	0,010 (%2)	0,000 (%0)	0,000 (%0)	0,134 (%30)	0,296 (%67)	0,44 (%100)	0,66
Orta Luminal B	55	0,105 (%18)	0,000 (%0)	0,000 (%0)	0,046 (%8)	0,426 (%74)	0,576 (%100)	0,76
Orta Bazal benzeri	55,4	0,059 (%20)	0,000 (%0)	0,000 (%0)	0,046 (%15)	0,194 (%65)	0,299 (%100)	0,55
Yüksek Luminal B	64,8	0,119 (%21)	0,014 (%2)	0,000 (%0)	0,064 (%11)	0,380 (%66)	0,576 (%100)	0,76
Yüksek HER2-zengin	76,2	0,165 (%37)	0,000 %(0)	0,000 (%0)	0,000 (%0)	0,277 (%63)	0,442 (%100)	0,66

Beş panel üyesinin tümü için toplam SS, 0-100 ölçeğinde 1 ROR biriminden azdır. Tüm panel üyeleri için, varyansın büyük kısmı çalıştırma-içi varyanstan (tekrarlanabilirlik) gelmiştir. Merkezler veya operatörler arasında neredeyse hiç fark yoktur. Panel üyesine göre merkezin önemi için bir olasılık oranı testi, merkez farklılıklarının istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermiştir ($p > 0,05$). Her lot için, ortalama ROR skorları, her panel üyesi için 1 ROR biriminden daha azdır ve genel varyansa ortalama olarak yaklaşık %20 katkıda bulunur.

16.1.3 Alt Tip Adlandırma ve Risk Sınıflandırmasının Uyumluluğu

Tüm panel üyeleri için, alt tip sonucu ile panel üyesinin intrinsik alt tipi arasında %100 uyum vardır. Tüm numuneler için ölçülen ve beklenen risk grubu arasında %100 uyum vardır.

Doku Tekrarlanabilirliği

16.1.4 Çalışma Tasarımı

Aynı FFPE bloğundan alınan kopya meme tümörü doku örneklerinin kullanıldığı üç merkezde kör ve randomize karşılaştırmalı bir çalışma, Prosigna Testi kullanılarak nCounter Analiz Sisteminde test edilmiştir. Doğrulanmış invaziv duktal ve/veya lobüler karsinomu olan Hormon Reseptörü pozitif meme kanseri hastalarından yakın zamanda alınmış 43 FFPE meme tümörü numunesi, çalışmanın bir parçası olarak test edilmiştir. Tüm doku numuneleri işlenmek üzere uygun test merkezine gönderilmiştir. 43 numune bağımsız olarak üç ayrı patolog tarafından incelenmiştir. Patolojik incelemesi yapılan her doku numunesi için, her merkezde tek bir operatör tarafından tanımlanan test prosedürü kullanılarak doku makroskopik diseksiyonu, RNA ekstraksiyonu ve Prosigna Testiyle testten oluşan bir test uygulaması gerçekleştirilmiştir. Doku numunelerinin her birinden izole edilen RNA, ayrı test uygulamalarında iki kez test edilmiştir. Bu çalışmanın yürütülmesinde üç lot RNA izolasyon kiti (merkez başına bir adet) ve tek bir lot test kiti reaktifi kullanılmıştır. Tümör yüzey alanı $\geq$ 100 mm^2 olarak ölçüldüğünde RNA ekstraksiyonu için tek bir slayt girilmiş, tümör yüzeyi < 100 mm^2 olarak ölçüldüğünde 3 slayt girilmiş, minimum tümör yüzey alanı koşulu 4 mm^2 olmuştur.

16.1.5 Test Özeti

Üç merkezin her birinde değerlendirilen kırk üç (43) doku örneği için adlandırma oranı Tablo 13'te gösterilmektedir.

Tablo 13: Her merkezde adlandırma oranı

Merkez	Sonuç Alınan Yüzde	Geçer/Toplam
1	%95	41/43
2	%93	40/43
3	%100	43/43

Kırk numune tüm merkezlerde sonuç vermiştir (tek merkezde bir numunenin RNA izolasyonunun tekrarlanması gerekmiştir), 1 numune 2 merkezde ve 2 numune tek merkezde sonuç vermiştir. Doku incelemesini ve RNA izolasyon özelliklerini geçen numunelerin yüzde yüzü (%100) Prosigna Testinden geçer sonuçlar vermiştir. 4/5 RNA izolasyon başarısızlıkları için ölçülen tümör yüzey alanı $\leq$ 15 mm^2 olup, teste girilen toplam doku alanı 50 mm^2'den azdır.

43 örnek hem nod negatif hem de nod pozitif hastaları içermiştir. 43 numuneden hesaplanan test sonuçları, tüm numunelere nod-negatif veya nod-pozitif eşikler uygulanırken geniş bir ROR skorları aralığını (94 birim), 4 intrinsik alt tipin tümünü ve tüm risk kategorilerini temsil eder. Sonuçları tek bir merkezde olan iki numune, merkezler arasında karşılaştırma yapmak için mevcut veri olmadığından sonraki tüm istatistiksel analizlerin dışında bırakılmıştır.

16.1.6 Varyans Bileşenleri Analizi

Parametrik olmayan bir Kruskal-Wallis testi kullanıldığında risk kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı (α = 0,05) farklılıklar yoktur, bu nedenle varyans bileşenleri modeli tüm risk kategorilerine aynı anda uyar.

Tablo 14, 41 doku numunesinin tamamını kullanan varyans bileşenleri analizinin sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 14: Varyans Bileşenleri (Doku Tekrarlanabilirlik Çalışması)

Varyans Bileşenleri				Toplam SS
Merkez	Blok İçi	Rezidüel	Toplam	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Merkez bileşeni Prosigna Testinde sistematik merkeze özel varyasyonu ölçer, "Blok İçi" bileşeni doku numunesi inceleme/işleme fonksiyonu olarak farklılık gösteren rastgele varyasyonu veya FFPE blok içi varyasyonu ölçer ve rezidüel varyasyon çalıştırmadan çalıştırmaya değişkenliği ve Prosigna Testi içinde uygulama içindeki değişkenliği birlikte ölçer. Merkez bileşeni, blok içindeki rastgele değişkenliğe göre çok küçüktür, bu da merkezler arasındaki ortalama farklılıkların ihmal edilebilir olduğunu gösterir (toplam varyansın < %1'i). Rezidüel varyasyon, daha az numuneye ancak daha fazla replika ölçümlere sahip olan RNA kesinliği çalışmasında ölçülen eşdeğer değişkenlik ile tutarlıdır (RNA kesinliği çalışması için 0,39'luk Prosigna reaktif lotu varyansı içinde ortalama tek merkeze kıyasla 0,51 varyans).

Tablo 15, Doku İşleme Değişkenliğinin (bu çalışmada Tablo 14'teki merkez ve blok içi bileşenler) toplamını ve aynı zamanda RNA kesinliği çalışmasından elde edilen toplam RNA İşleme Değişkenliğini (Tablo 12'de test edilen beş panel üyesi ortalaması) kullanan toplam değişkenliği özetlemektedir. Doku işleme ile ilişkili preanalitik faktörler, test için birincil varyasyon kaynağıdır (toplam varyansın %94'ü). Tüm varyasyon kaynakları dahil toplam SS, 2,9'a eşittir; bu, Prosigna Testinin, %95 güvenle 6,75'lik iki ROR değeri arasındaki farkın güvenilir bir ölçümü olduğunu gösterir.

Tablo 15: Toplam Değişkenlik (Doku ve RNA İşleme)

Doku İşleme Değişkenliği	RNA İşleme Değişkenliği	Toplam Değişkenlik	Toplam SS
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Risk Kategorisi ve Alt Tip Sınıflandırmalarının Uyumua

Hasta alt tipine ve risk sınıflandırmasına (düşük/orta/yüksek risk) göre merkezler arasındaki uyum, tüm numunelere nod-negatif ve nod-pozitif sınıflandırmalar için ilgili risk eşik değerlerinin uygulandığı Tablo 16'da gösterilmiştir. Tam tip %95 güven aralıkları parantez içinde gösterilir ve her iki merkezde de sonuçları olan numune sayısı parantez içinde gösterilir. Ortalama uyum son sütunda gösterilir. Her karşılaştırma için uyum iki adımda hesaplanmıştır. İlk olarak, her doku örneği için, kabul edilen dört olası sonuç çiftinin (merkez 1'de iki * merkez 2'de iki) oranı hesaplanmıştır. İkinci adımda, verilen karşılaştırmada her iki merkezde de sonuç veren tüm doku numunelerinde bu oranların ortalaması alınmıştır.

Tablo 16: Nod Durumuna Göre Alt tip ve Risk-Kategorisi Uyum Özeti

Karşılaştırma türü	İkili Uyum			Ortalama Uyum
	Merkez 1 - Merkez 2 (n = 40)	Merkez 1 - Merkez 3 (n = 41)	Merkez 2 - Merkez 3 (n = 40)	
Alt tip	%96,3 [%86,4-%99,5]	%98,8 [%91,0 - %100]	%95 [%83,1- %99,3]	%97
Risk Kategorisi Nod-Negatif	%87,5 [%73,2 - %95,8]	%92,7 [%80,1 - %98,4]	%90 [%76,4 - %97,2]	%90
Risk Kategorisi Nod-Pozitif	%88,8 [%75,9 - %96,0]	%92.7 [%80,1 - %98.4]	%91,3 [%79,2 - %97,4]	%91

Her karşılaştırma için (alt tip ve nod-negatif ve nod-pozitif risk kategorileri), merkezler arasındaki ortalama uyum en az %90'dır. Merkezler arasında veya içinde risk kategorisinin düşük riskten yüksek riske (veya tersi) değiştiği hiçbir örnek yoktur. 6 kopyanın tamamında özdeş alt tipleri vermeyen yalnızca iki örnek (41 örnek arasında) vardır:

1. Bir merkezde bir numunenin çift Luminal A sonuçları ve diğer iki merkezin her birinde çift Luminal B sonuçları vardır..
2. Bir merkezde bir numunenin çift Luminal A sonuçları, başka bir merkezde çift HER2 zengin sonuçlar ve üçüncü merkezde Luminal A ve HER2 zengin sonuçların her biri vardır.

16.2 Hassasiyet / RNA girdisi

RNA Girdisi Çalışma Tanımı

Çalışmada, test spesifikasyonu (500, 250 ve 125 ng) dahilindeki üç RNA girdi seviyesi ve spesifikasyon dışındaki iki ek RNA girdi seviyesi (625, 62,5 ng) boyunca 13 meme tümörü RNA örneği test edilmiştir. Her numune, spesifikasyondaki her seviyede çift ölçümleri ve spesifikasyon dışındaki her seviye için tek bir ölçümü içeren tek bir test uygulamasında her kit lotuyla (toplam 2 lot) test edilmiştir. Her test uygulamasına çift boş (yani hedef yok) ölçümler dahil edilmiştir. Tek bir numune, yalnızca tek bir lotla test edilmiştir.

RNA Girdisi Çalışma Sonuçları

Ölçülen tüm boş numuneler (n = 46) sinyal eşiğinin çok altındadır ve başarısız bir test sonucu vermiştir (%0 adlandırma oranı). Test spesifikasyonu (n = 138) dahilindeki tüm tümör RNA ölçümleri, geçer bir test sonucu vermiştir (%100 adlandırma oranı). Girdisi spesifikasyonun (625 ng) üzerinde olan numunelerin yüzde yüzü (%100) geçer bir test sonucu vermiştir. Spesifikasyonun (62,5 ng) altındaki girdide test edilen numunelerin (10/12) yüzde seksen üçü (%83), lot 2'de %100 ile lot 1'de bir test sonucu vermiştir.

13 örnek için ortalama ROR skoru geniş bir aralığı (20–82) kapsamıştır. Risk grubu sınıflandırması (düşük/orta/yüksek), test edilen 13 numune için tüm RNA girdi seviyelerinde %100 uyumludur. Tablo 17, RNA girdisinin bir fonksiyonu olarak ROR Skorundaki değişimi özetlemektedir. RNA girdi seviyeleri arasındaki ortalama ROR skor farkı, farklar için SS ve %90 güven aralığı, farklı RNA girdi seviyelerinden oluşan ROR skorlarının 250 ng hedef seviyesi kullanılarak oluşturulanlara eşdeğer olup olmadığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Kabul kriterini karşılamak için güven aralığının tamamen (-3,3 ROR) kapsanması gerekmiştir. Test spesifikasyon aralığının (125 ve 500 ng RNA) uç noktalarındaki iki seviyede, ROR skorları, test edilen iki kit lotunun her biri için 250 ng hedef girdi konsantrasyonundakilere eşdeğerdir. Test spesifikasyonunun dışındaki her seviye için ROR skorları lotlardan biri için eşdeğerdir, ancak diğeri için değildir.

Tablo 17: ROR Skoru Fark Özeti. Sayı analize dahil edilen numune sayısına eşittir.

Kit Lot	Kütle (ng)	Sayı	Ortalama ROR Farkı	Fark SS	Alt Güven Sınırı	Üst Güven Sınırı
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

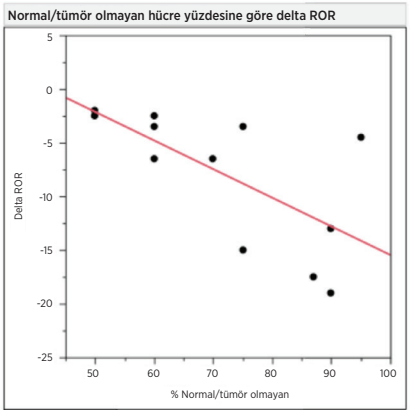
16.3 Girişim Testi

Komşu Normal/Tümör Dışı Doku

Komşu normal/tümör dışı meme dokusu, FFPE meme tümörü bloklarında yaygın olarak bulunur ve patoloji incelemesi üzerine invaziv meme karsinomu alanından ayrı bir alan olarak tanımlanabilir. Yukarıdaki Prosigna Testi prosedürü, komşu normal dokunun makroskopik diseksiyonla çıkarılmasını belirtmektedir. Test sonuçlarına normal doku kontaminasyonu riskini değerlendirmek için, patolojik olarak doğrulanmış infiltratif duktal karsinom ve yaklaşık %50-95 çevreleyen normal/tümör dışı doku içeren toplam 13 FFPE meme tümörü bloğu, çevre dokunun makroskopik diseksiyonu ile ve makroskopik diseksiyon olmadan test edilmiş ve ROR skorundaki fark (delta ROR) belirlenmiştir.

Ortalama olarak, makroskopik diseksiyon yapılmış tümör numunesinin ROR değeri, normal/tümör dışı doku çıkarılmadığında gözlemlenenin neredeyse 8 ROR birim üzerindedir. Şekil 14, normal doku miktarı arttıkça (%95'e kadar makroskopik diseksiyonla çıkarılmayan), rapor edilen ROR skorunun hastanın nüks riskinin eksik tahmin edilmiş veya negatif yanlılık gösteren (-19 ROR birimine kadar) nokta tahmini olma riskinin arttığını göstermektedir.

Şekil 14: Delta ROR'da normal/tümör dışı doku etkisi



Nekrotik, hemorajik ve DCIS doku girişimi

Test sonuçlarına nekrotik/hemorajik/DCIS kontaminasyonu riskini değerlendirmek için, patolojik olarak doğrulanmış invaziv meme karsinomu içeren toplam 11 FFPE meme tümörü bloğu (3 DCIS, 5 Nekrotik, 3 hemorajik) ve girişime sebep olan dokunun yaklaşık %10-30'u makroskopik diseksiyonlu ve makroskopik diseksiyonsuz olarak test edilmiştir ve ROR skorundaki (delta ROR) fark belirlenmiştir. Test edilen seviyelerde, prosedüre dahil edilen kan/hemorajik, DCIS ve nekrotik dokunun etkisi, rapor edilen ROR skoru (< 6 ROR birimi) üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahiptir. Makroskopik diseksiyonlu ve makroskopik diseksiyonsuz on bir nekrotik, hemorajik ve DCIS numunesi arasında risk kategorisi atamasında %100 uyum vardır.

İnsan Genomik DNA'sı

Prosigna Testi prosedürü, DNaz I ile sindirim yoluyla insan genomik DNA'sının (gDNA) çıkarılmasını içerir. Test sonuçlarına gDNA kontaminasyonu riskini değerlendirmek için, patolojik olarak doğrulanmış infiltratif duktal karsinom içeren on (10) FFPE meme tümörü bloğu, prosedür içerisinde DNaz adımı atlanarak, insan genomik DNA'sının +/- çıkarılması ile test edilmiştir. Test edilen örneklerde, gDNA DNaz I ile çıkarıldığında, Düşük ve Orta risk gruplarında ROR skoru ortalama olarak 4 ila 5 birim daha düşüktür (bkz. Tablo 18). DNaz ile işleme tabi tutulmamış numuneler daha sonra DNaz I (işlem sonrası) ile işlendiğinde, ROR skorları, protokolde DNaz işlemi ile orijinal olarak gözlemlenen ROR değerleriyle eşleşir. Raporlanan ROR skorunun, gDNA varlığında bir hastanın nüks riskinin fazla tahmin edilmiş veya pozitif yanlılık gösteren (7 ROR birimine kadar) nokta tahmini olması riski vardır. Ek olarak, DNaz I tedavisi olmayan numuneler için hesaplanan sinyal, Prosigna Testi ile test edilmeden önce RNA miktarını ölçmek için kullanılan absorbans ölçümündeki girişim nedeniyle DNaz I uygulananlardan önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşüktür.

Tablo 18: Tümör dokularında ROR üzerinde DNaz ile tedavinin etkisi

ROR Kategorisi	Test Edilen FFPE Örnekleri	ROR Farkı DNaz I ile- DNaz I olmadan			ROR Farkı DNaz I ile - DNaz I ile (tedavi sonrası)		
		Ortalama	Min	Maks	Ortalama	Min	Maks
Düşük	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Orta	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Yüksek	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinik Performans

Prosigna Meme Kanseri Prognostik Gen İmza Testini doğrulamak için iki klinik doğrulama çalışması yürütülmüştür. Her iki çalışmanın birincil amacı, nüks riski skorunun (ROR), standart klinik değişkenlerin 10 yıl ve üzeri uzak nüks olmaksızın sağkalım için ek prognostik bilgi sağladığına dair yayınlanmış gözlemleri doğrulamaktır. Ayrıca, her iki çalışmadan elde edilen ikincil bir amaç, Luminal A ve Luminal B hastalarının 10 yılda istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı uzak nüks olmaksızın sağkalıma sahip olduğuna dair önceki gözlemleri doğrulamayı amaçlamıştır. Bu iki çalışmanın giriş kriterleri ve sonuçları benzer olduğundan, iki veri tabanı birleştirilmiştir ve bireysel çalışmalarla aynı hedeflere sahip ileriye dönük olarak tanımlanmış bir analiz planı ile analiz edilmiştir.

Kombine Analiz: TransATAC ve ABCSG-8'den kombine Prosigna Test Sonuçlarının kullanımıyla Risk Eğrilerinin Oluşturulması

Kombine analizden elde edilen tedavi ve klinik özelliklerin bir özeti aşağıda bulunabilir. Bireysel çalışma tasarımı ve analiz bilgileri için lütfen sırasıyla Çalışma 1 ve 2 için aşağıdaki bölümlere bakın.

Analiz

Tablo 19: Çalışma 1 ve 2'nin Kombine Analizinde Tedavi ve Klinik Özelliklerin Özeti

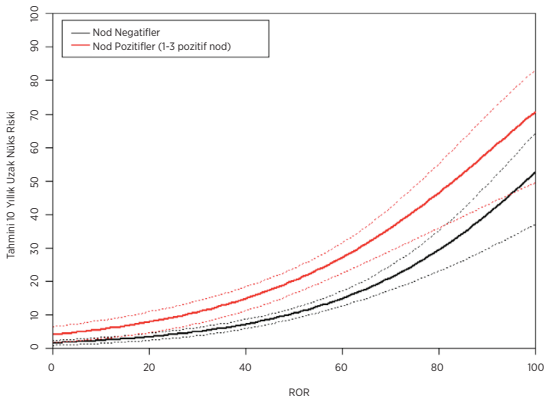
Özellik	Değer	Nod-Negatif (n = 1 786)		1–3 Pozitif Nod (n = 590)		≥ 4 Pozitif Nod (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1 047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Tedavi	Biraz Anastrozol	377 (%51,0)	528 (%50,4)	102 (%49,0)	184 (%48,2)	31 (%57,4)	25 (%51,0)
	Yalnızca Tamoksifen	362 (%49,0)	519 (%49,6)	106 (%51,0)	198 (%51,8)	23 (%42,6)	24 (%49,0)
Evre	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)
Tümör Boyutu	≤ 1 cm	122 (%16,5)	219 (%20,9)	13 (%6,2)	37 (%9,7)	3 (%5,6)	2 (%4,1)
	1–2 cm	420 (%56,8)	568 (%54,3)	83 (%39,9)	193 (%50,5)	15 (%27,8)	18 (%36,7)
	2–3 cm	157 (%21,2)	213 (%20,3)	77 (%37,0)	122 (%31,9)	18 (%33,3)	23 (%46,9)
	> 3 cm	40 (%5,4)	47 (%4,5)	35 (%16,8)	30 (%7,9)	18 (%33,3)	6 (%12,2)
HER2 Durumu	Negatif	649 (%87,8)	984 (%94,0)	186 (%89,4)	367 (%96,1)	47 (%87,0)	46 (%93,9)
	Pozitif	90 (%12,2)	63 (%6,0)	22 (%10,6)	15 (%3,9)	7 (%13,0)	3 (%6,1)
Nüksler	Uzak	79 (%10,7)	91 (%8,7)	50 (%24,0)	64 (%16,8)	31 (%57,4)	10 (%20,4)
	Tümü	117 (%15,8)	121 (%11,6)	59 (%28,4)	73 (%19,1)	34 (%63,0)	10 (%20,4)
NanoString Intrinsik Alt tip	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-benzeri	7 (%0,9)	6 (%0,6)	2 (%1,0)	2 (%0,5)	0 (%0)	0 (%0)
	HER2-zengin	27 (%3,7)	32 (%3,1)	11 (%5,3)	14 (%3,7)	3 (%5,6)	2 (%4,1)

Her iki çalışmada da 5 yıllık Tamoksifen'den oluşan bir tedavi kolu vardır. TransATAC'ta diğer çalışma kolu 5 yıllık Anastrozol'den oluşurken, ABCSG-8 çalışmasında ikinci kol 2 yıllık Tamoksifen ve ardından 3 yıllık Anastrozol'den oluşmuştur. Uzak Nüks (Distant Recurrence, DR), tüm klinik ve tedavi değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak modellendiğinde, tedavi, DR'nin bir prediktörü olarak anlamlı ölçüde katkıda bulunmamıştır ($p = 0,66$). Bu çalışmalar arasındaki diğer temel farklar, TransATAC çalışmasının Evre 3 tümörlü hastaları içermesi ve TransATAC çalışmasında genel nüks oranının ABCSG-8 çalışmasına göre daha yüksek olmasıdır.

Bulgular

Şekil 15, nod-negatif ve nod-pozitif (1-3 pozitif nod) hasta gruplarının her biri için ayrı Cox-orantılı zarar modellerine dayalı %95 güven bantlarıyla ROR skorunun bir fonksiyonu olarak 10 yıllık DR riskini göstermektedir.

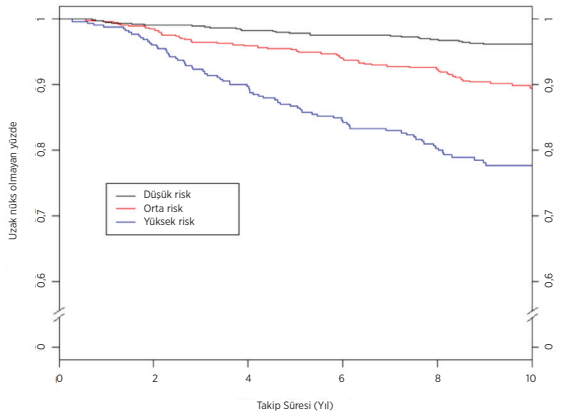
Şekil 15: Nod Durumuna göre %95 Güven Aralığı ile On Yıllık Tahmini DR Riski



Şekil 16, nod-negatif hastalar için risk grubuna göre Kaplan-Meier ve insidans grafiklerini gösterir ve Şekil 17, 1-3 pozitif nodu olan nod-pozitif hastalar için aynı grafikleri gösterir. Her şekilde, numune boyutlarının ayrıntıları, olay sayıları ve 10 yılda uzak nüks olmaksızın tahmini yüzde risk grubu ile sunulmuştur. Nod pozitif hasta grubunda, Kaplan-Meier eğrisinde güven aralığına neden olan

önceden tanımlanmış düşük risk gruplarında çok az sayıda hasta vardır ve bu nedenle 10 yıllık DRFS tahmini çok geniş olmuştur.

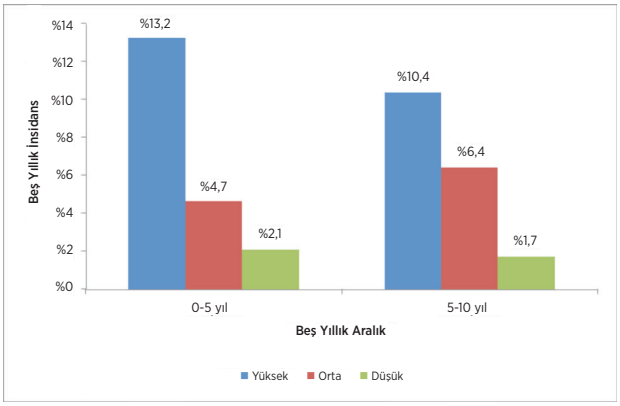
Şekil 16A: Nod-Negatif Hastalar için Risk Grubuna Göre DRFS



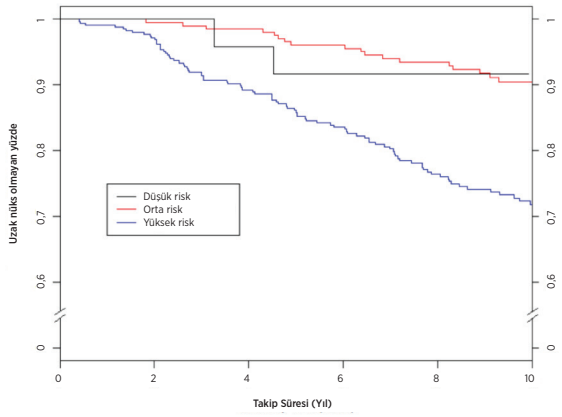
Şekil 16 A için Veri Özeti: Nod-Negatif Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca y Gerçekleşen Ola Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	875 (%49)	31	%96,2 [%94,7 - %97,3]
Orta	551 (%31)	53	%89,2 [%86,1 - %91,7]
Yüksek	360 (%20)	73	%77,7 [%72,8 - %81,9]
Toplam	*1 786 (%100)*	*157*	

Şekil 16B: Beş Yıllık Aralıklarla Nod-Negatif Hastalar için Risk Grubuna Göre İnsidans



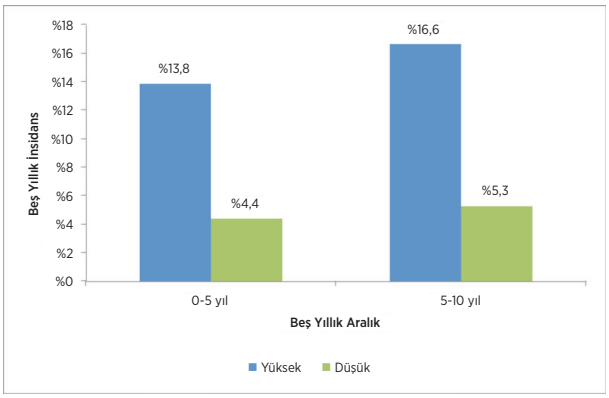
Şekil 17A: 1 ila 3 Pozitif Nodu olan Nod Pozitif Hastalarda Risk Grubuna göre DRFS



Şekil 17A için Veri Özeti: Risk Grubuna göre 1 ila 3 Pozitif Nodu olan Nod-Pozitif Hastalar için DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	24 (%4)	2	%91,7 [%70,6 - %97,8]
Orta	211 (%36)	18	%90,4 [%85,2 - %93,9]
Yüksek	355 (%60)	87	%71,8 [%66,3 - %76,6]
Toplam	*590 (%100)*	*107*	

Şekil 17B: Beş Yıllık Aralıklarla Nod-Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için Risk Grubuna Göre İnsidans



Şekil 17B'de, düşük riskli nod pozitif grupta 2 olayı olan sadece 24 hasta olduğundan, bu hastalar geç nüks analizi için orta düzey hastalarla birleştirilmiştir.

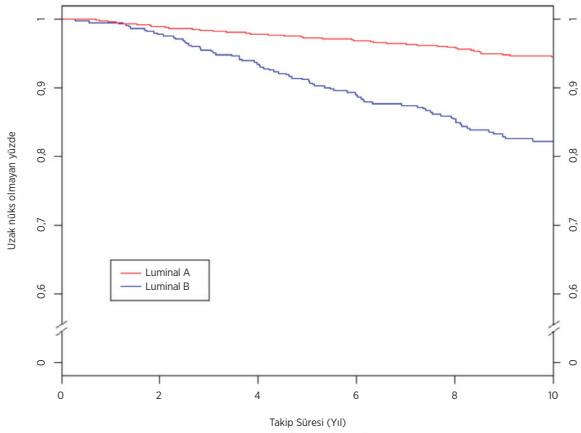
4 veya daha fazla pozitif noda sahip birleşik veri tabanındaki 103 hastanın tümü yüksek riskli olarak sınıflandırılır. Tablo 20, bu hastalar için on yıllık DRFS oranlarını göstermektedir.

Tablo 20: 4 veya daha fazla pozitif nodu olan hastalar için 10 yıllık DRFS oranları

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Yüksek	103	39	%57,4 [%46,3 - %67,0]

Kombine çalışmalarda hastaların çoğunluğu (%96) ya Luminal A ya da Luminal B idi. Şekil 18, nod negatif hastalar için DRFS'nin Luminal alt tipine göre bir karşılaştırmasını göstermektedir.

Şekil 18: Nod Negatif Hastalarda İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri

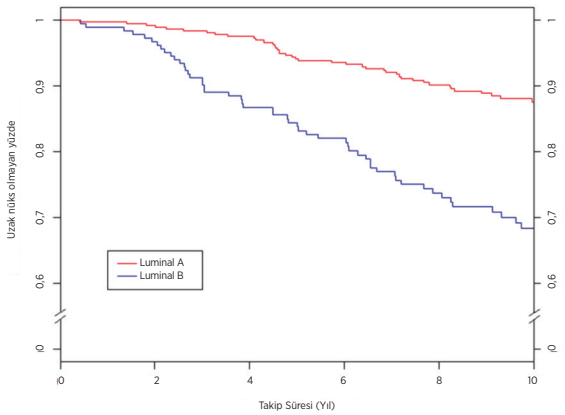


Veri Özeti Şekil 18 için Veri Özeti: Nod Negatif Hastalarda İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Luminal A	1254	62	94,6 [93,1 – 95,8]
Luminal B	460	75	81,9 [77,7 – 85,3]
Toplam	*1.714*	*137*	

Şekil 19, 1-3 pozitif nodu olan nod pozitif hastalar için aynı karşılaştırmayı göstermektedir. Her iki grup için, Luminal A ve Luminal B hastalarının DRFS'leri arasında anlamlı farklılıklar vardır.

Şekil 19: Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalarda İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri



Şekil 19 için Veri Özeti: 1-3 Pozitif Nodu olan Nod Pozitif Hastalarda İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Luminal A	375	41	87,6 [83,5 – 90,8]
Luminal B	186	52	68,3 [60,4 – 75,0]
Toplam	*561*	*93*	

Kombine veri tabanında 4 veya daha fazla pozitif noda sahip sadece 98 Luminal alt tip hasta vardır. Tablo 21, Luminal B alt tipine sahip olduklarında çok daha yüksek risk gösteren bu hastalar için on yıllık DRFS oranlarını göstermektedir.

Tablo 21: Luminal Alt Tipe Göre 4 Veya daha Fazla Pozitif Nodu olan hastalarda On Yıllık DRFS oranları

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Luminal A	62	17	68,3 [53,6 – 79,3]
Luminal B	36	20	38,0 [21,4 – 54,5]
Toplam	*98*	*37*	

Geç Nüks Analizi

Daha önce açıklanan birleşik analiz verilerinde, her bir risk grubu içindeki olay oranları, 10 yıllık aralıkta Şekil 16B ve 17B'de görülebileceği gibi sabit değildir. Geç nüks dönemindeki DR'yi daha iyi anlamak için, beş yıl boyunca uzak nüks olmayan hasta alt kümesi (toplam 2.163 hasta[8]) için yukarıda açıklanan birleşik verilerin post-hoc retrospektif analizi yapılmıştır. Bunlardan 1.605'i nod negatif hasta ve 488'i nod pozitif hastadır (1-3 pozitif nod). Her nod grubu için, şekil 20 ve 21'de 5. yılda x ekseninin altındaki değerler, risk grubuna göre beş yılda risk altındaki hasta sayısını, yani geç nüks analizi için uygun olan hasta sayısını gösterir.

Tablo 22, geç nüks analizinde nod negatif ve nod pozitif (1-3 nod) hastalar için tedavi ve klinik özelliklerin bir özetini sunmaktadır.

Tablo 22: Geç Nüks Analizi için Tedavi ve Klinik Özellikler Özeti

Özellik	Değer	Nod Negatif (n = 1 605)		Nod Pozitif (1–3 Nod) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Tedavi	Biraz Anastrozol	480	346	153	89
	Yalnızca Tamoksifen	464	315	158	88
Evre	iyi	192	158	46	36
	Orta	752	394	265	105
	Kötü	0	109	0	36
Tümör Boyutu	≤ 1 cm	204	116	35	11
	1–2 cm	526	376	165	74
	2–3 cm	183	139	90	64
	> 3 cm	31	30	21	28
HER2 Durumu	Negatif	888	590	300	157
	Pozitif	56	71	11	20
Nüksler	Uzak	41	40	28	29
	Tümü	71	78	37	37
NanoString Intrinsik Alt tip	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Bazal Benzeri	4	5	0	1
	HER2-Zengin	21	18	6	10

Birincil amaç, ROR Skorunun 5 ila 10. yıllar arasında standart klinik değişkenler üzerinde DRFS için önemli ek prognostik bilgiler sağlama yeterliliğini değerlendirmektir. Yalnızca Klinik Tedavi Skoru'ndan (Clinical Treatment Score, CTS) oluşan boş bir model, olasılık oranı (LR) testi kullanılarak CTS ve ROR'dan oluşan alternatif bir modelle karşılaştırılmıştır. ROR, tüm hastalar ($p < 0,0001$) için standart klinik değişkenlerin yanı sıra nod negatif ($p < 0,0001$) ve nod pozitif (1-3 nod) hastalar için 5 yıllık DRFS sonrası standart klinik değişkenler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bilgiler eklemiştir ($p < 0,0001$).

Tablo 23, tek değişkenli analize ve hem ROR Skorunu hem de CTS'yi içeren çok değişkenli bir analize dayalı 10 puanlık bir değişiklik için zarar oranlarının bir özetini göstermektedir. ROR Skoru için zarar oranlarının tümü, CTS için ayarlama yapıldıktan sonra bile 1'den önemli ölçüde farklıdır. C-endeksleri Tablo 22'de ayrıca gösterilmektedir. Her iki grup için, C-endeksi bilgi verilmeyen 0,5 değerinden önemli ölçüde farklıdır.

Tablo 23: Geç Nüks Testinin Özeti

Pozitif Nod Sayısı	N	Zarar Oranı: 10 Puanlık ROR Skoru Değişikliği		%95 Güven Aralıkları ile C-İndeksi		
		Tek Değişkenli Analiz	Çok Değişkenli Analiz	C-Index	Daha Düşük	Daha Yüksek
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

İki çalışmadaki hastaların çoğu HER2 negatifti. Tablo 24, nod negatif ve nod pozitif (1-3 nod) kadınlar için HER2 durumunun dağılımını gösterir. Her iki grup için, araştırmalardaki kadınların %90'ından fazlası HER2 negatiftir.

Tablo 24: Pozitif Nod Sayısına göre HER-2 Durumu Dağılımı

Hasta Alt Kümesi	Status HER2		Toplam
	Negatif	Pozitif	
Nod Negatif Hastalar	1 478 (%92,1)	127 (%7,9)	1 605
1-3 Pozitif Nodu olan Nod Pozitif Hastalar	457 (%93,6)	31 (%6,4)	488

Tablo 25, belirli bir nod grubundaki tüm hastalara uyan çok değişkenli model ile gruptaki tüm HER2-negatif hastalara uyan modelin karşılaştırmasını gösterir. İstatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

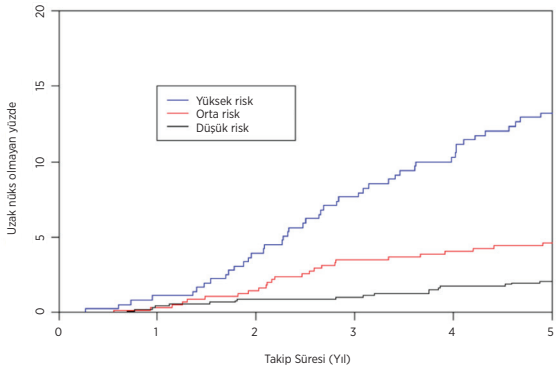
Tablo 25: 10 puanlık ROR Skoru Değişikliği için Çok Değişkenli Zarar Oranları: Alt Grup içerisindeki HER-2 Negatif Hastalara Kıyasla Alt Grup İçerisindeki Tüm Hastalar

Pozitif Nod Sayısı	Tüm Hastalar [%95 Güven Aralığı]	HER2-Negatif hastalar [%95 Güven Aralığı]
Nod Negatif Hastalar	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
1-3 Pozitif Nodu olan Nod Pozitif Hastalar	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Risk grupları arasındaki karşılaştırma, sırasıyla nod-negatif ve nod-pozitif (1-3 nod) hastalarda risk grubuna göre oluşturulan erken ve geç uzak nüks için insidans eğrilerini gösteren Şekil 20 ve 21'de daha detaylı olarak incelenmiştir. İnsidans eğrileri, erken nüks dönemini (ilk 5 yıl içinde) ve geç nüks dönemini (tanıdan sonraki 5 ile 10 yıl arasını) kapsar. X ekseninin hemen altındaki her rakam, risk altındaki kadın sayısını ve kümülatif insidansı gösterir. Şekillerin altındaki özet tablolar, 5 yıllık tedavinin tamamlanmasından sonra DR olmayan kadınlarda 5 veya 10. yılda kümülatif DR oranı için güven aralıklarını göstermektedir. Şekil 21'de gösterilen nod pozitif (1-3 nod) hastalar için, Düşük Risk grubundaki hasta sayısının az olması nedeniyle Düşük ve Orta Risk grupları birleştirilmiştir.

Düşük Riskli popülasyonun, her bir risk grubu için kümülatif insidans eğrileri ve ilişkili zarar oranları ile gösterildiği gibi, 5 yıllık endokrin tedavisinden sonra 5 ve 10. yıllar arasında düşük bir nüks olasılığı vardır. Buna karşılık, Orta ve Yüksek riskli popülasyonlar, 5 yıllık endokrin tedavisinden sonra ısrarlı bir geç uzak nüks riskine sahiptir. Orta ve Yüksek Riskli nod negatif popülasyonlar arasındaki sonuç farkı ilk 5 yılda belirlenir (DR oranı = Yüksek Riskli Hastalar için %13,2 [%9,6 - %16,7] ve Orta Düzeyde Riskli Hastalar için %4,7 [2,9 - %6,4)]) ve 10 yıla kadar devam eder; ancak, 5 yıllık endokrin tedavisinden sonra Orta ve Yüksek Risk grupları için nüks oranları çok benzerdir.

Şekil 20A: 0-5 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod-Negatif Hastalar

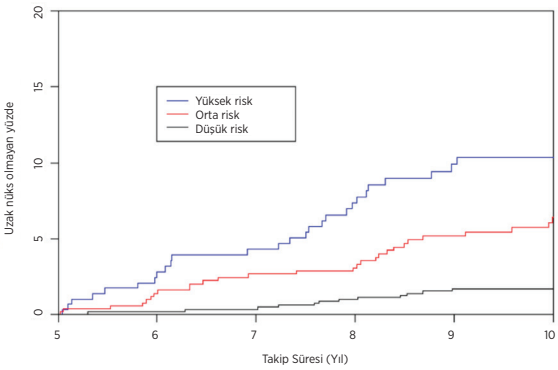


Risk Grubu		Risk Altında (% Uzak Nüks)				
Yüksek:	360	352 (1,1)	339 (3,9)	319 (7,7)	307 (10,3)	287 (13,2)
Orta:	551	546 (0,4)	533 (1,5)	515 (3,5)	506 (4,1)	500 (4,7)
Düşük:	875	866 (0,5)	850 (0,9)	842 (1,0)	830 (1,7)	818 (2,1)

Şekil 20A için Veri Özeti: 0-5 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod-Negatif Hastalar

Risk Grubuna Göre Tedavinin Tamamlanmasından Beş Yıla Kadar İnsidans Eğrileri [%95 Güven Aralıkları]		
Yüksek	Orta	Düşük
%13,2 [%9,6 - %16,7]	%4,7 [%2,9 - %6,4]	%2.1 [%1,1 - %3,1]

Şekil 20B: 5-10 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod Negatif Hastalar

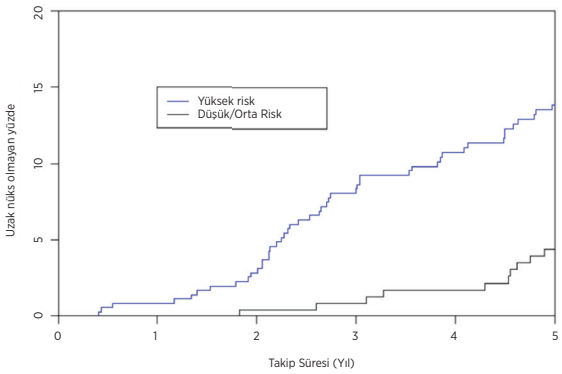


Risk Grubu:		Risk Altında (% Uzak Nüks)				
Yüksek:	287	268 (2,8)	256 (4,3)	235 (7,4)	189 (9,9)	144 (10,4)
Orta:	500	478 (1,4)	460 (2,7)	440 (3,1)	367 (5,2)	256 (6,4)
Düşük:	818	799 (0,2)	785 (0,4)	748 (1,0)	653 (1,7)	453 (1,7)

Şekil 20B için Veri Özeti: 5-10 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod Negatif Hastalar

Uzak Nüks Olmaksızın Tedavinin Tamamlanmasından Beş Yıl Sonra Risk Grubuna Göre DR Oranları [%95 Güven Aralıkları]		
Yüksek	Orta	Düşük
%10,4 [%6,6 - %14]	%6,4 [%4,1 - %8,7]	%1,7 [%0,8 - %2,6]

Şekil 21A: 0-5 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod- Pozitif (1–3 Nod) Hastalar

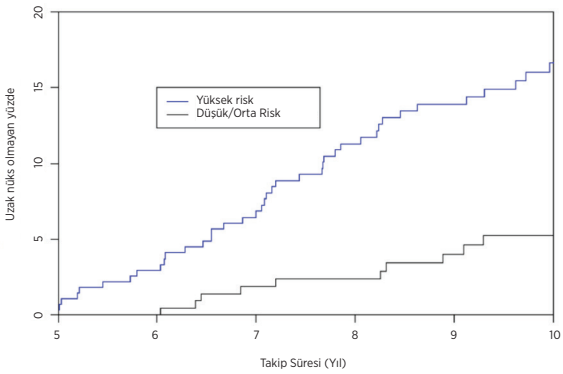


Risk Grubu:		Risk Altında (% Uzak Nüks)				
Yüksek:	355	349 (0,8)	337 (2,8)	313 (8,3)	291 (10,7)	272 (13,8)
Düşük/Orta:	235	232 (0,0)	230 (0,4)	228 (0,9)	224 (1,7)	216 (4,4)

Şekil 21A için Veri Özeti: 0-5 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod-Pozitif (1–3 Nod) Hastalar

Risk Grubuna Göre Tedavinin Tamamlanmasından Beş Yıla Kadar İnsidans Eğrileri [%95 Güven Aralıkları]	
Yüksek	Düşük / Orta
%13,8 [%10,1 - %17,4]	%4,4 [%1,7 - %7,0]

Şekil 21B: 5-10 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod- Pozitif (1–3 Nods) Hastalar



Risk Grubu:		Risk Altında (% Uzak Nüks)				
Yüksek:	272	254 (3,0)	233 (6,9)	214 (11,3)	179 (13,9)	130 (16,6)
Düşük/Orta:	216	211 (0,0)	204 (1,9)	195 (2,4)	158 (4,0)	111 (5,3)

Şekil 21B için Veri Özeti: 5-10 Yıldan itibaren Risk Grubuna Göre Uzak Nüks için İnsidans Eğrileri: Nod-Pozitif (1–3 Nod) Hastalar

DR Olmaksızın Tedavi Tamamlanmasından Beş Yıl Sonra Risk Grubuna göre DR Oranları [%95 Güven Aralıkları]	
Yüksek	Düşük / Orta
%16,6 [%11,7 - %21,3]	%5,3 [%2,0 -%8,4]

Kombine Analiz Sonuçları

ROR Skorunun, tanıdan sonraki 5 ile 10 yıl arasındaki geç nüks periyodunda ve beş yıl boyunca uzak nüksü olmayan hastalar için yapılan kombine çalışmada standart klinik değişkenlerin üzerine önemli prognostik bilgiler eklediği gösterilmiştir. Nod sayısına özgü kohortların her biri için başlangıçta tanımlanan risk grupları kullanılarak, risk gruplarının tam hasta kümesini önemli ölçüde farklı geç uzak nüks riskine sahip gruplar halinde sınıflandırdığı gösterilmiştir. Hem sürekli hem de ROR Skoruna dayalı risk grubu analizleri, çeşitli alt gruplarda benzer prognostik bilgiler göstermiştir. HER2-negatif hastaları kullanan sonuçlar arasında tüm hastalara kıyasla önemli bir fark görülmemiştir.

TransATAC ve ABCSG-8 çalışmalarının her birinde, ROR'un hem sürekli bir ölçüm olarak dahil edildiğinde hem de önceden tanımlanmış üç risk grubu kullanılarak dahil edildiğinde standart klinik ve tedavi değişkenlerinin üzerine ve üstüne önemli prognostik bilgiler eklediği gösterilmiştir. TransATAC çalışmasında olay oranının ABCSG-8 çalışmasına göre daha yüksek olması gibi, iki çalışmanın farklı risk profilleri vardır: bu durum, literatürde bildirilen ATAC (%90,8) ve ABCSG8'in (%92,5) kontrol kollarındaki DRFS (%) karşılaştırılarak açıkça görülmektedir. Bu analiz, bireysel çalışmaların sonuçlarına göre diğer hasta popülasyonları için daha genellenebilir olması beklenen risk profilleri oluşturmak için eşit ağırlıktaki iki çalışmadan elde edilen verileri birleştirmiştir.

Çalışma 1: - Arimideks veya Tamoksifen ile tedavi edilen nod negatif veya nod pozitif, hormon reseptörü pozitif erken evre meme kanserli menopoz sonrası kadınlarda uzak nüks riskinin tahmini: Bir TransATAC çalışması

Çalışma Tasarımı

Klinik doğrulama çalışması, nüks riski skorunun (ROR), mevcut tüm hasta numunelerini kullanarak standart klinik değişkenlere kıyasla Uzak Nüks olmaksızın Hayatta Kalma (DRFS) için ek prognostik bilgiler sağladığını doğrulamak amacıyla tasarlanmıştır. Bu çalışmada, ATAC çalışmasına katılan bir hasta alt kümesinin FFPE meme tümörü dokusundan izole edilen RNA kullanılmıştır. ATAC çalışmasına, hastaların 1 mg anastrozol (yani arimideks) artı bir tamoksifen plasebo, 20 mg tamoksifen artı anastrozol plasebo veya bir tamoksifen/arimidex kombinasyonu ile 5 yıllık endokrin tedavisi alacak şekilde randomize edildiği üç çalışma kolunda (1:1:1) 9 366 hasta dahil edilmiştir. Kombinasyon tedavi grubu, tek başına tamoksifen üzerinde hiçbir etkililik veya tolere edilebilirlik faydası göstermediği için ilk analizden sonra kesilmiştir. ATAC çalışması monoterapi kollarının 10 yıllık medyan takibinin güncellenmiş güvenlilik ve etkililik bilgileri için FDA gerekliliklerini karşıladığı kısa süre önce bildirilmiştir. Bu analizde, hormon reseptörü pozitif hastalarda, tamoksifen ile karşılaştırıldığında anastrozol ile tedavi edilen hastalarda DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) ve DRFS'de (HR = 0,85) önemli bir iyileşme olmuştur. Anastrozol ve tamoksifen arasındaki uzak nüks olmaksızın sağkalımdaki mutlak farklılıklar zamanla 5 yılda %2,7'den 10 yılda %4,3'e yükselmiştir. TransATAC projesi, ATAC hastalarından geriye dönük olarak arşiv histopatoloji FFPE bloklarından bir doku bankası oluşturmak için TA/01 protokolü kapsamında 2002 yılında başlatılmıştır.

ATAC çalışmasının monoterapi kollarına randomize edilen hormon reseptörü pozitif meme kanserli 4 160 kadından toplam 2 006 blok elde edilmiştir. Bu FFPE bloklarından 1 372'si Birleşik Krallık'taki hastalardan toplanmıştır ve Genomic Health® Oncotype Dx® testi kullanılarak analiz için yeterli invaziv tümör içermiştir. Oncotype Dx Recurrence Score® (Nüks Skoru, RS), FFPE bloklarından belirlenmiştir ve çalışma sonuçları, HR+, anastrozol veya tamoksifen ile tedavi edilen menopoz sonrası meme kanseri hastalarında uzak nüks olmaksızın sağkalımı tahmin etmeye yönelik RS'yi klinik olarak doğrulanmıştır. Oncotype Dx çalışmasından kalan RNA, Londra'da, -70°C'de saklandığı Royal Marsden Hastanesine gönderilmiştir. Oncotype Dx çalışmasından toplam 1 017 hasta > 500 ng RNA'ya sahipti ve NanoString klinik doğrulama çalışmasının bir parçası olarak NanoString tarafından test edilmiştir.

Bu çalışmada, test ile elde edilen intrinsik alt tipleri kullanılmıştır ve önceden tanımlanmış sıralı bir yaklaşım kullanarak ROR skorunun iki versiyonunu değerlendirilmiştir. Her biri 0-100 arasında değişen iki farklı ROR skoru, daha önce yayımlandığı gibi 50 test geninin tümü veya bir 46 gen alt kümesi kullanılarak hesaplanmıştır. Her durumda, katsayılar, her bir intrinsik alt tipi, bir çoğalma skorunu ve tümör boyutunu hesaplamak için kullanılan 50 veya 46 genle Pearson korelasyonunu içeren bir Cox modelinden hesaplanmıştır. Tüm analizler 10 yıllık takip verileri üzerinde yapılmıştır.

Birincil sonlanım noktası, uzak nüks olmaksızın sağkalımdır (DRFS). Bu, tanıdan itibaren uzak nüks veya meme kanseri nedeniyle ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanır. İkincil sonlanım noktası, nüks olmaksızın sağkalımdır (RFS). Bu, tanıdan itibaren ilk nüks (lokal, bölgesel veya uzak) veya meme kanseri nedeniyle ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanır.

Tüm mevcut hasta numuneleri kullanılarak, 50 ve 46 gene dayalı sıralı ROR testlerinde birincil hedefi değerlendirmek için çok değişkenli Cox orantılı zararlar (PH) modelleri oluşturulmuştur. Model, standart klinik değişkenleri (yaş, tümör evresi, tümör boyutu, nod durumu, adjuvan tedavi) içermiştir. Daha sonra bir Cox modeli oluşturulmuştur ve ROR'un Klinik Tedavi Skorunda (CTS) yer alan bilgilerin üzerine istatistiksel olarak anlamlı (α = 0,05) ek prognostik bilgi ekleyip eklemediğini test etmek için bir olasılık oranı testi kullanılmıştır. CTS, klinik araştırmacı tarafından standart patolojinin bir ölçüsü olarak geliştirilen klinikopatolojik faktörlerin optimize edilmiş bir kombinasyonudur. Birincil analizler, farklı hasta alt grupları (tümü, nod negatif, nod pozitif veya yalnızca HER2 negatif) ve uç noktalar (DRFS veya RFS) için tekrarlanmıştır.

Nod negatif ve nod pozitif hastaların her biri için, ROR'un bir fonksiyonu olarak 10 yıllık DR riskini tahmin etmek için Cox modelleri (CTS hariç) kullanılmıştır. Bu model tahminlerine dayanarak, üç risk grubu şu şekilde tanımlanmıştır:

Düşük Risk:	< 10 Yılda %10 DR Olasılığı
Orta Risk:	10 Yılda %10 - %20 DR Olasılığı
Yüksek Risk:	10 Yılda > %20 DR Olasılığı

Analiz

Her bir risk grubu için Kaplan-Meier grafikleri oluşturulmuştur. Birincil analizde açıklanan olasılık oranı testleri (iki istatistiksel modelin uyumunu karşılaştırmak için kullanılır), Genomic Health'in Oncotype Dx testi (RS, Recurrence Score) ve sorumlu araştırmacının immünohistokimya tabanlı testi (IHC4) için yapılmıştır. Bu sonuçlar, her bir skorlama sisteminin CTS'ye ek olarak ne ölçüde ek prognostik bilgi sağladığını belirlemek için ROR için elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. IHC4 testi TransATAC çalışma verileri kullanılarak oluşturulduğundan, diğer testlerle karşılaştırmaları zordur, bu nedenle IHC4 sonuçları daha fazla tartışılmayacaktır.

Tablo 26: Demografik Verilerin Ve Klinik özelliklerin Özeti

Özellik	Mevcut Çalışma (n = 1,007)		RNA Alınan İlk Çalışma (n = 1,231)	ATAC'ın Dahil Edilmeyen Tek Ajanlı Kolları (n = 2,929)
	# Hasta	% Hasta		
Nodal Durum				
Negatif	701	%70	%71	%68
Pozitif	268	%27	%25	%25
Bilinmeyen	38	%4	%4	%7
Tümör Boyutu				
≤ 1 cm	138	%14	%67	%70
1 – 2 cm	523	%52		
2 – 3 cm	253	%25	%33	%30
> 3 cm	93	%9		
Tümör Evresi				
İyi	213	%21	%27	%25
Orta	601	%60	%57	%59
Kötü	193	%19	%16	%17
Yaş				
Ortalama	64,4 yıl		64,3	66,1

Tablo 27: İlave Klinik Özellikler

Özellik	Hasta Sayısı	Hasta %'si
Alt tip		
Bazal Benzeri	9	%1
HER2 zengin	41	%4
Luminal A	692	%69
Luminal B	265	%26
Tedavi		
Anastrazol	513	%51
Tamoksifen	494	%49
Nüksler		
Tümü	210	%21
Uzak	160	%16
HER2 Durum		
Negatif	888	%88
Pozitif	119	%12

Bulgular

Birincil analiz testleri, ROR skorunun, standart klinik değişkenlerin (KTS) üzerine uzak nüks olmaksızın sağkalım için ek prognostik bilgi sağladığını göstermiştir. Aşağıda rapor edilen tüm ROR verileri, Prosigna Test ile raporlanan ROR'un temeli olduğundan, 46 gene dayanmaktadır.

Tablo 28: ROR için Primer Analiz Testi

Etkisiz Model	Alternatif Model	ΔLR χ^2	χ^2 p-Değer
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

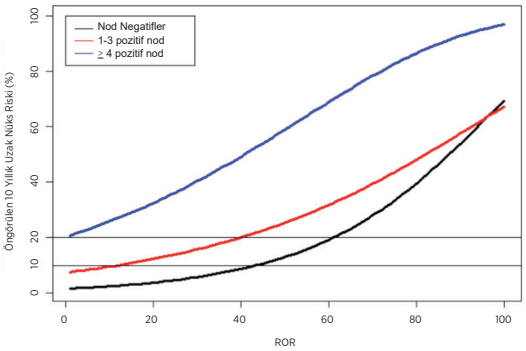
İkincil analizler, ROR'un uzak nüks olmaksızın sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve klinik olarak ilgili çok sayıda alt grupta CTS'nin ötesinde prognostik bilgi eklediğini göstermiştir.

Tablo 29: Önceden Tanımlanan Alt Gruplar için Primer Analizin Tekrarı

Hasta Grubu	Sonlanım Noktası	Hasta Sayısı	Olay Sayısı	CTS+ROR / CTS	
				ΔLR χ^2	χ^2 p-Değer
Tümü	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-Negatif	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Nod-Negatif	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Nod-Pozitif	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-Negatif Nod-Negatif	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

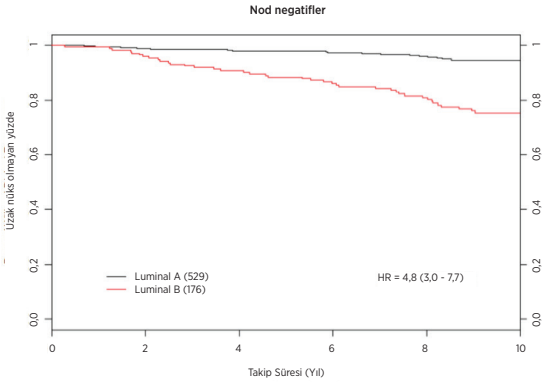
Birincil ve İkincil Analizler ROR'un sürekli olarak Tüm Hastalar ve Tüm Alt gruplarda DRFS ile ilgili olduğunu göstermiştir.

Şekil 22: Nodal Durum Grubunda ROR Skoru Analizi ile Tahmini On Yıllık Öngörülen Uzak Nüks Riski

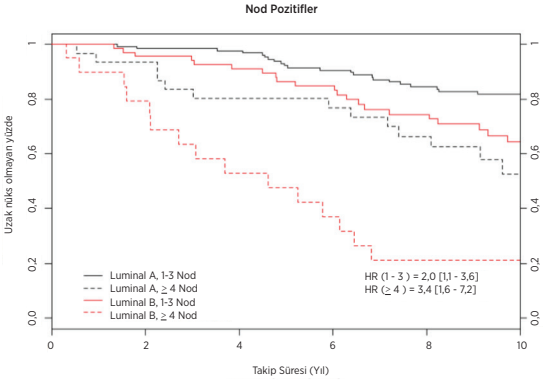


İkincil Analizler nodal durumla tanımlanan her hasta alt grubunda Luminal A ve Luminal B alt tiplerinin anlamlı ölçüde farklı sonuçları olduğunu göstermiştir.

Şekil 23: İntrinsik Alt Tipe Göre Nod Negatif Hastalarda DRFS için Kaplan Meier Eğrileri

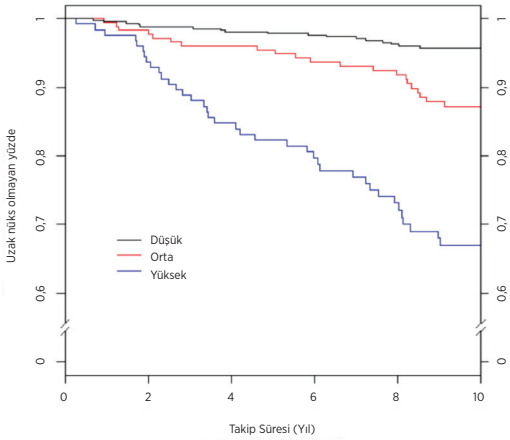


Şekil 24: İntrinsik Alt Tipe Göre Nod Pozitif Hastalarda DRFS için Kaplan Meier Eğrileri



Şekil 25 ve 26, her nod kategorisi içinde, düşük riskli olduğu tahmin edilen hastaların mutlak klinik riskinin, yüksek riskli olduğu tahmin edilen hastaların mutlak klinik riskinden önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir: düşük riskli olduğu tahmin edilen hastalarda gözlenen 10 yıllık DR oranları %10'un altındayken, yüksek riskli olduğu öngörülen hastalarda, 10 yıllık DR oranları %30'un üzerinde gözlemlenmiştir.

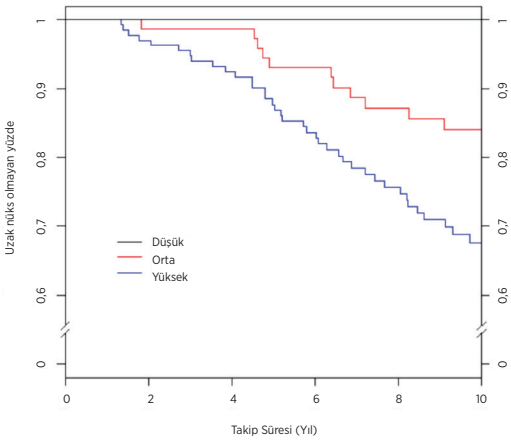
Şekil 25: CTS Hariç Nod Negatif Hastalarda Risk Grubuna göre DRFS



Şekil 25 için Veri Özeti: CTS Hariç Nod Negatif Hastalarda Risk Grubuna göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	431 (%58)	17	%96 [%94 – %98]
Orta	180 (%24)	22	%86 [%81 – %92]
Yüksek	128 (%17)	38	%67 [%59 – %76]
Toplam	*739 (%100)*	*77*	

Şekil 26: CTS Olmaksızın 1-3 Pozitif Nodlu Hastalarda Risk Grubuna göre DRFS



Şekil 26 için Veri Özeti: CTS Olmaksızın 1-3 Pozitif Nodlu Hastalarda Risk Grubuna göre DRFS

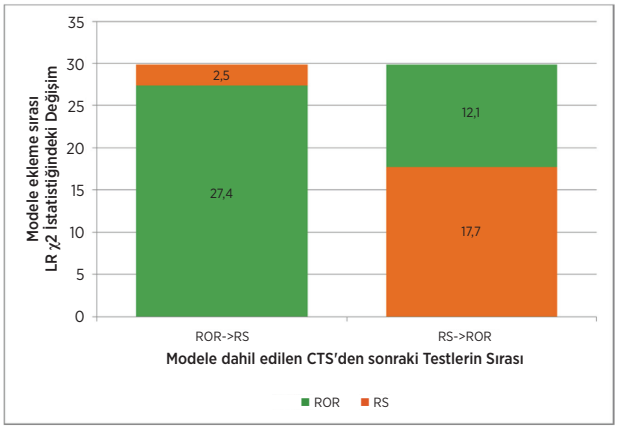
Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	6 (%3)	0	%100 [N/A]
Orta	74 (%35)	11	%84 [%76 - %93]
Yüksek	134 (%63)	38	%68 [%59 - %77]
Toplam	*214 (%100)*	*49*	

ROR ile RS Kıyaslaması

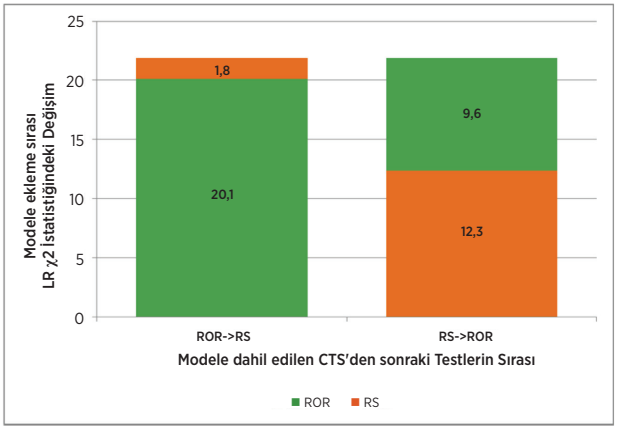
ROR skorlarına sahip 1.007 numunenin tümü için Oncotype Dx test sonuçları mevcuttur, ancak IHC sonuçları yalnızca 940 numune için mevcuttur. Üç testin tümünün karşılaştırılmasını sağlamak için bu bölümdeki sonuçlar, üç yöntemin tümü için test sonuçlarına sahip olan 940 örneğe dayanmaktadır (ancak IHC4 burada bildirilmemiştir). Olasılık oranı testleri tek bir değişkenin eklenmesi için sunulmuştur, bu nedenle eklenen bilgilerin istatistiksel olarak anlamlı olması için (α = 0.05), 1-serbestlik derecesi χ^2 istatistiğindeki değişimin 3.84'ten büyük olması gerekir. Aşağıdaki şekiller, prognostik test başka bir prognostik teste eklendiğinde eklenen bilgileri ve sıralı CTS'yi gösterir. Her eklemede, eklenen bilgi χ^2'deki değişiklikle ölçülür.

CTS'ye ilaveten RS'ye eklenen ROR: prognostik bilgiler

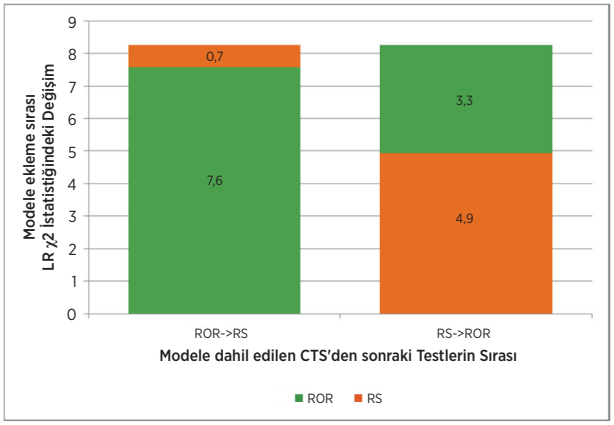
Şekil 27: Tüm Hastalarda CTS Ötesinde DRFS için Prognostik Bilgiler (n = 940)



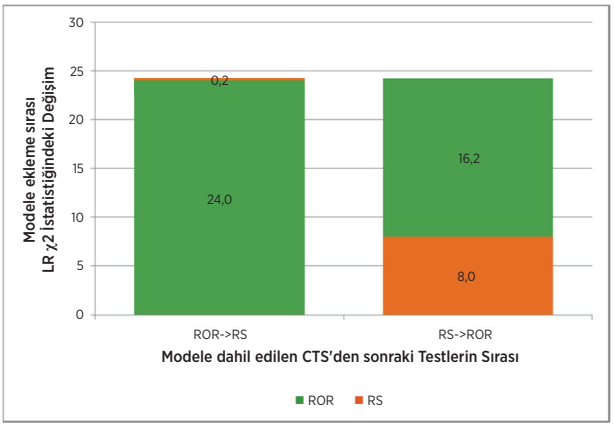
Şekil 28: Nod Negatif Hastalarda CTS Ötesinde DRFS için Prognostik Bilgiler (n = 683)



Şekil 29: Nod-Pozitif Hastalarda CTS Ötesinde DRFS için Prognostik Bilgiler (n = 257)



Şekil 30: Nod Negatif HER2 Negatif Hastalarda CTS Ötesinde DRFS için Prognostik Bilgiler (n = 649)



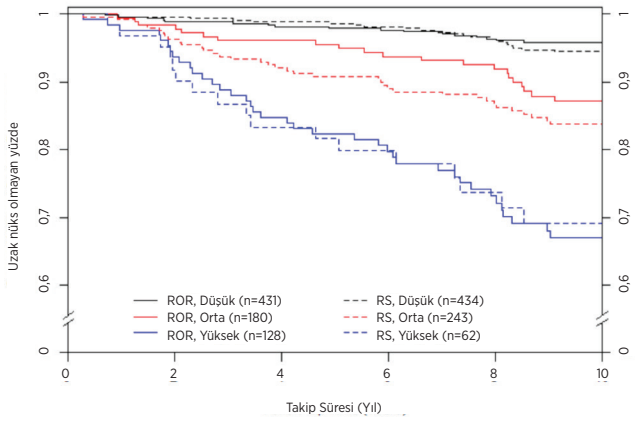
Şekil 27 ila 30, iki prognostik test sırayla eklendiğinde CTS'nin ötesinde eklenen bilgileri gösterir. Her eklemede, eklenen bilgi χ^2 istatistiğindeki değişiklikle ölçülür. Örneğin, CTS (tüm hasta verileri) dahil edildikten sonra eklenen ilk test ROR olduğunda, χ^2 istatistiğindeki değişiklik 27,4'tür. Modelde CTS ve ROR olmasıyla, RS eklenmesi, χ^2 istatistiğinde anlamlı olmayan değil (1 serbestlik dereceli χ^2testi için kritik değer 3,84'tür) 2,5'lik bir değişikliğe neden olmuştur; yani, hem CTS hem de ROR modelde olduğunda, RS önemli bilgi eklememektedir. Ancak, eklenen ilk test RS ise, ROR'da CTS ve RS kombinasyonuna dahil edilmeyen bilgiler hala mevcuttur. Her iki test de nod pozitif hastalarda CTS'ye eklendiğinde prognostik önem gösterir, ancak testlerin hiçbiri muhtemelen daha küçük örnek boyutu nedeniyle ikinci bir eklenen test olarak anlamlılık göstermez. Nod-negatif HER2-negatif hasta alt kümesi için RS, CTS + ROR'a önemli prognostik bilgi eklemez. Öte yandan, ROR, CTS + RS'ye önemli prognostik bilgiler ekler.

RS'ye karşılık ROR: Risk Grupları Sonucu

İki testin hastaları riske göre nasıl ayırdığını karşılaştırmak için, her testin TransATAC popülasyonunda 10 yılda uzak nüks riskine ilişkin tahminine dayalı olarak risk grupları tanımlanmıştır. Aynı riske sahip hastaları içeren risk gruplarını tanımlamak için TransATAC çalışmamızın sonuçlarına göre her test için risk gruplarını tanımlayan risk puanı eşikleri seçilmiştir. Bu karşılaştırılabilir risk gruplarını elde etmek için Oncotype DX için kullanılan eşik noktaları Genomic Health tarafından kullanılanlardan farklıdır. Her test için, düşük risk grubu prospektif olarak %10'dan daha az tahmini nüks riski olan hastalar olarak tanımlanmıştır. Her test için, orta risk grubu ileriye dönük olarak %10 ila %20 arasında tahmini nüks riski olan hastalar olarak tanımlanmıştır. Her test için, yüksek risk grubu ileriye dönük olarak %20'den fazla tahmini nüks riski olan hastalar olarak tanımlanmıştır. Aşağıdaki şekil, her bir test tarafından tanımlanan risk gruplarının boyutlarını ve sonuçlarını özetlemektedir.

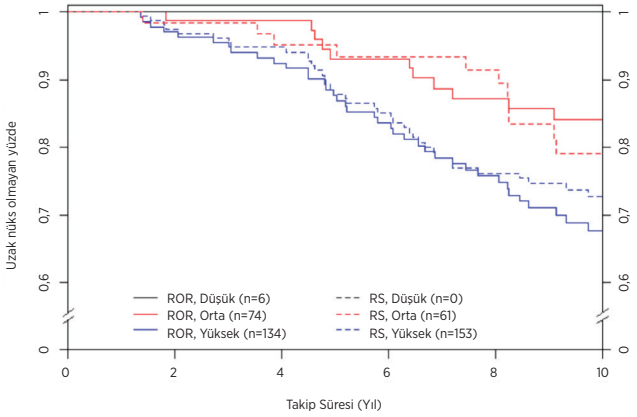
Şekil 31, Prosigna'nın Oncotype DX'e göre %26 oranında daha az hastayı orta risk grubuna atadığı sonucunu göstermektedir (180 hastaya karşın 243 hasta). Ayrıca, Prosigna, Oncotype DX'ten daha fazla hastayı yüksek risk grubuna atamıştır; bununla birlikte, her bir test tarafından tanımlanan düşük risk ve yüksek risk grupları, örtüşen Kaplan-Meier eğrilerinde gösterildiği gibi benzer sonuçlara sahiptir. Bu gözlem, TransATAC çalışmamızın bağımsız araştırmacılarının, Prosigna'nın düşük ve yüksek risk grupları arasında eşdeğer veya daha yüksek ayrımla, orta risk grubuna Oncotype DX RS'den daha az hasta atadığı sonucuna varmalarına yol açmıştır.

Şekil 31: Nod negatif hastalar için Oncotype DX'in RS Skoruna kıyasla, Prosigna'nın ROS Skoru büyük oranda daha fazla sayıda yüksek riskli ve daha az sayıda orta riskli hasta tanımlamıştır.



1-3 pozitif nodu olan nod pozitif hastalarda tek başına ROR kullanıldığında, < %10 uzak nüks riskinin olduğu tahmin edilen 6 hasta vardır. Bu hastaların hiçbirinde çalışma boyunca herhangi bir olay olmamıştır. Bu hastalardan biri 7,9 yıl boyunca gözlenmiştir ve diğerlerinin hepsinde en az 9,9 yıllık takipte DR görülmemiştir, bu da düşük riskli olduğu tahmin edilen nod pozitif hastaların gerçekten de düşük riskli olduğunu gösterir. RS için düşük risk grubu olmadığından karşılaştırma için log-rank testleri kullanılmamıştır.

Şekil 32: CTS kullanmadan 10 Yıllık DRFS Risk Grubu Sınıflandırması: Nod Pozitif Hastalar (1-3 Nod) (ROR/ROR)



Klinik Çalışma 1 Sonuçları

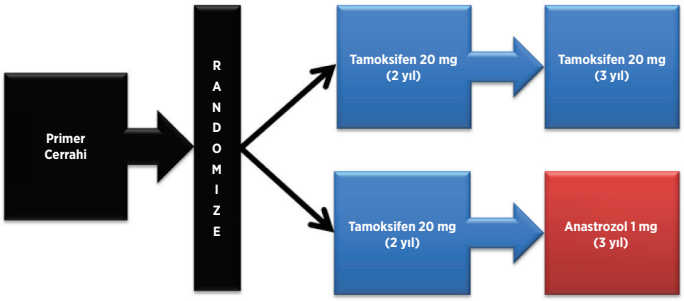
Birincil analiz, ROR'un tüm hastalarda ve önceden tanımlanmış klinik olarak ilgili tüm alt gruplarda standart klinik değişkenlerin (CTS) ötesinde önemli prognostik bilgiler eklediğini göstermiştir. ROR'un hastaları, nod negatif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı sonuçlara sahip 3 risk grubuna ayırdığı gösterilmiştir. Luminal A ve Luminal B intrinsik alt tiplerinin, nod durumundan bağımsız olarak önemli ölçüde farklı DRFS ve RFS'ye sahip olduğu gösterilmiştir. Prognostik gösterge RS (Oncotype Dx'ten 21-Gen Nüks Skoru) ile karşılaştırıldığında, ROR tüm hastalarda ve klinik olarak ilgili alt gruplarda RS'nin ötesine prognostik bilgi eklemiştir. Ayrıca, nod negatif grupta ROR, RS ile karşılaştırıldığında, yüksek risk grubuna atanan hasta sayısını iki katına çıkarmış ve düşük ve yüksek risk grupları arasındaki sonuçlardaki farklılıkları azaltmadan orta risk grubuna atanan hasta sayısını önemli ölçüde azaltmıştır.

Çalışma 2: Prosigna Testini Kullanarak tek başına Adjuvan Sistemik Endokrin Tedavi alan Hormon Reseptörü Pozitif, menopoz sonrası Meme Kanserli hastalar için prognoz: bir ABCSG-8 Çalışması

Çalışma Tasarımı

Çalışma kohortu, 1996 ve 2004 yılları arasında ABCSG-8 çalışmasına kaydolan hastalardan retrospektif olarak toplanan ve ABCSG tümör bankasında arşivlenen FFPE meme tümörü doku örneklerinden oluşur[13]. HR+, erken evre meme kanseri olan toplam 3.901 menopoz sonrası kadın, tedaviden önce iki yıl adjuvan Tamoksifen ve ardından üç yıl Arimidex® (anastrozol) veya beş yıl adjuvan Tamoksifen almak üzere randomize edilmiştir. Çalışmanın tedavi yapısı Şekil 33'te gösterilmektedir.

Şekil 33: ABCSG-8 Çalışması Çalışma Tasarımının Şeması



Doğrulama kohortu, retrospektif olarak arşivlenmiş ABCSG tümör bankasından doku örneklerinin toplanabileceği ve bilgilendirilmiş onam alınabileceği değerlendirilebilir ABCSG-8 kohortu veya hastanın vefat ettiği bölümü temsil eder. Orijinal çalışma için uygunluk kriterlerini karşılayan hastalar, yalnızca NanoString testi için doku bulunmadığında veya hastanın yeniden onayı alınamadığında dışlanmıştır. Tümör bloğu ve hasta onamı bulunan tüm numuneler bu çalışmanın bir parçası olarak test edilmiştir.

Bu çalışmada, test ile elde edilen intrinsik alt tipleri kullanılmış ve önceden tanımlanmış bir analiz planı kullanarak ROR skoru değerlendirilmiştir. 0-100 arasında değişen ROR skoru, daha önce yayınlanmış 50 test geninden bir 46 gen alt kümesi kullanılarak hesaplanmıştır. ROR katsayıları, her bir intrinsik alt tipi, bir proliferasyon skorunu ve gros tümör boyutunu belirlemek için kullanılan 46 genle Pearson korelasyonunu içeren bir Cox modelinden hesaplanmıştır. Tüm analizler maksimum takip verileri üzerinde yapılmıştır.

Birincil sonlanım noktası, uzak nüks olmaksızın sağkalımdır (DRFS). Bu, tanıdan itibaren uzak nüks veya meme kanseri nedeniyle ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanır. İkincil sonlanım noktası, nüks olmaksızın sağkalımdır (RFS). Bu, tanıdan itibaren ilk nüks (lokal, bölgesel veya uzak) veya meme kanseri nedeniyle ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanır.

Mevcut tüm hasta numuneleri kullanılarak, sıralı ROR testlerinde birincil hedefi değerlendirmek için çok değişkenli Cox Orantılı Zararlar (PH) modelleri oluşturulmuştur. Model, standart klinik değişkenleri (yaş, tümör evresi, gros tümör boyutu, nod durumu, adjuvan tedavi) içermiştir. Daha sonra bir Cox modeli oluşturulmuştur ve ROR'un Klinik Tedavi Skorunda (CTS) yer alan bilgilerin üzerine istatistiksel olarak anlamlı ($\alpha = 0,05$) ek prognostik bilgi ekleyip eklemediğini test etmek için bir olasılık oranı testi kullanılmıştır. CTS, standart patolojinin bir ölçüsü olarak geliştirilmiş klinikopatolojik faktörlerin optimize edilmiş bir kombinasyonudur. Birincil analizler, farklı hasta alt grupları (tümü, nod-negatif, nod-pozitif veya yalnızca HER2 negatif) ve uç noktalar (DRFS veya RFS) için tekrarlanmıştır.

Analiz

Birincil bilimsel amacın, ROR'un standart klinik değişkenler üzerine önemli prognostik bilgiler eklediğini göstermek olduğu sıralı bir yaklaşım kullanılmıştır. Birincil amaç, üç gruptan birine (düşük/orta/yüksek) kategorik risk sınıflandırmasının standart klinik değişkenlerin üzerine önemli prognostik bilgiler eklediğini göstermek için ilave bir gereklilik eklemiştir. Bu gereksinimi karşılamak için aşağıdakilerden her ikisinin de gösterilmesi gerekmiştir:

- Sürekli ROR skorunun standart klinik değişkenlerin üzerine önemli prognostik bilgiler eklediğini göstermek
- Hiçbir prognostik bilgi bulunmadığına ilişkin sıfır hipotezi reddedilirse, ROR tabanlı risk kategorilerinin standart klinik değişkenlerin üzerine prognostik değer kattığını göstermek

Mevcut tüm hasta numuneleri kullanılarak, çok değişkenli Cox Orantılı Zararlar (PH) modelleri, sıralı ROR testlerinde birincil hedefi ve ardından önceden tanımlanmış ROR tabanlı risk kategorilerini değerlendirmek için uyarlanmıştır. Modeller aşağıdaki kategorik standart klinik değişkenleri içermiştir (olası değerlerle):

- Yaş (> 65 veya < 65)
- Evre (G1 or G2/GX)
- Gros Tümör Boyutu (T1, T2/T3)
- Nodal Durum (N0, N+(1–3), N+(≥ 4))
- Adjuvan Tedavi (Tek başına Tamoksifen ya da Tamoksifen → Anastrozol)

N0 nod negatif hastaları, N+(1–3) 1–3 pozitif nodu olan nod pozitif hastayı ve N+(> 4) 4 veya daha fazla pozitif nodu olan nod pozitif hastaları belirtir. T1, çapı < 2 cm olan tümörü, T2, 2 cm'den büyük ancak 5 cm'den fazla olmayan tümörü ve T3, 5 cm'den büyük tümörü belirtir. Çalışmada sadece 14 adet T3 örneği vardır, bu nedenle bunlar T2 örnekleriyle birleştirilmiştir. İyi diferansiye (G1) tümörler, orta derecede diferansiye (G2) ve GX lobüler tümörlerin kombinasyonu ile karşılaştırılmıştır. GX lobüler tümörler, analiz amacıyla G2 tümörleri olarak tedavi edilmiştir, çünkü G2 tümörler bu amaçlanan kullanım hasta popülasyonunda en yaygın evredir.

Bu ortak değişkenler, modele bir Klinik Tedavi Skoru (CTS) şeklinde girilir. CTS'yi elde etmek için aşağıdaki model oluşturulmuştur:

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

Burada z'ler yukarıda listelenen klinik ve Tedavi değişkenlerini temsil eder ve CTS yukarıda elde edilen γ'lerin tahminleri kullanılarak tanımlanmıştır; yani., CTS = $\sum_j z_j \hat{\gamma}_j$.

Orantılı zararlar varsayımı, Schoenfeld artıkları kullanılarak test edilmiştir.

Doğrulama çalışmasına dahil edilen hastalar, orijinal ACBSG-8 çalışmasındakilere benzer özelliklere sahiptir.

Tablo 30: Klinik Özelliklerin Özeti

Özellik	Value	Dahil edilen (n = 1 478)		Dahil Edilmeyen (n = 2 236)		Toplam (n = 3 714)	
		#	%	#	%	#	%
Tedavi	Yalnızca Tamoksifen	741	%50,1	1 108	%49,3	1 849	%49,8
	Tamoksifen → Anastrozole	737	%49,9	1 128	%50,2	1 865	%50,2
ER Durumu	Negatif	14	%0,9	32	%1,4	46	%1,2
	Pozitif	1 464	%99,1	2 199	%98,3	3 663	%98,6
	Bilinmeyen	0	%0,0	5	%0,2	5	%0,1
Evre	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
Nodal Durum	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
PgR Durumu	Negatif	260	%17,6	424	%18,9	684	%18,4
	Pozitif	1 218	%82,4	1 805	%80,4	3 023	%81,4
	Bilinmeyen	0	%0,0	7	%0,3	7	%0,2
Tümör Evresi	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
Yaş	Median	63		NA		64	
	Aralık	41-79				41 – 80	

* > 9 pozitif nodu olan 1 hasta içerir.

Tablo 31: İlave Klinik Özellikler

Özellik	Değer	Hasta Sayısı	Hasta %'si
NanoString Intrinsik Alt Tip	LuminalA	1 004	%67,9
	LuminalB	418	%28,3
	HER2-Zengin	48	%3,2
	BasalBenzeri	8	%0,5
Nüksler	Uzak	155	%10,5
	Any	194	%13,1
HER2 Durum	Negatif	1 397	%94,5
	Pozitif	77	%5,2
	Bilinmeyen	4	%0,3

Bulgular

Test için mevcut 1 620 dokudan 25'i (%1,5) yeterli tümör için önceden tanımlanmış patoloji incelemesini geçmedi, canlı invaziv dokuya sahip 1 595 doku örneğinin 73'ü (%4,6) ekstrakte edilmiş RNA için önceden tanımlanmış QC spesifikasyonlarını geçmemiştir ve 1 522 RNA örneğinden 44'ü (%2,9) Prosigna sonuçları için test QC spesifikasyonlarında başarısız olmuş ve analiz için toplam 1 478 (%91,2) doku kullanılabilir durumda kalmıştır.

Analiz için mevcut olan 1 478 hastadan 155'inde uzak nüks ve 194'ünde lokal veya uzak nüks veya meme kanseri nedeniyle ölüm gerçekleşmiştir. Çalışma için medyan takip süresi 10 yıldır.

Birincil analiz testleri, ROR skorunun, uzak nüks olmaksızın sağkalım için standart klinik değişkenlerin (CTS) üzerine önemli ek prognostik bilgiler sağladığını göstermiştir.

Tablo 32: Birincil Analiz Testi Sonuçları

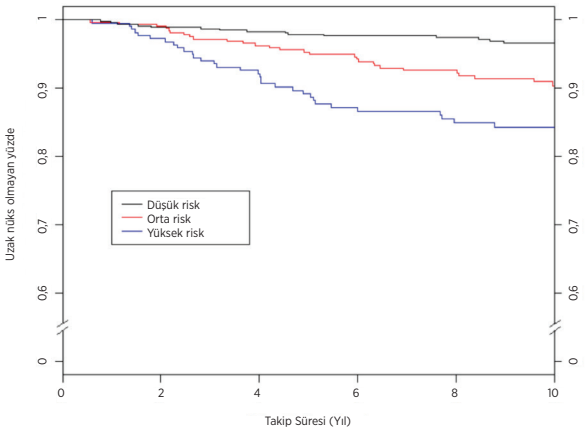
Etkisiz Model	Alternatif Model	ΔLR χ^2	χ^2 Kritik Değer (Serbestlik Düzeyleri)	χ^2 p-Değer
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Risk Grubu	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Ikincil analizler ROR'un uzak nüks olmaksızın sağkalımla önemli düzeyde ilişkili olduğunu ve çoklu klinik ilgili gruplarda CTS ötesinde prognostik bilgiler eklendiğini göstermiştir.

Tablo 33: Önceden Tanımlanan Alt Gruplar için Primer Analiz Testinin Tekrarı

Hasta Grubu	# Hasta Sayısı	# Olay Sayısı	CTS+ROR / CTS	CTS+Risk Grubu / CTS
			ΔLR χ^2 (Krit. Değer= 3,84)	ΔLR χ^2 (Krit. Değer = 5,99)
All	1 478	155	53,49	34,12
HER2-negatif	1 397	145	47,50	29,94
N0	1 047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negatif	984	79	21,69	20,32
N+(1–3)	382	59	25,99	19,94
N+(1–3), HER2-negatif	367	56	22,75	18,75

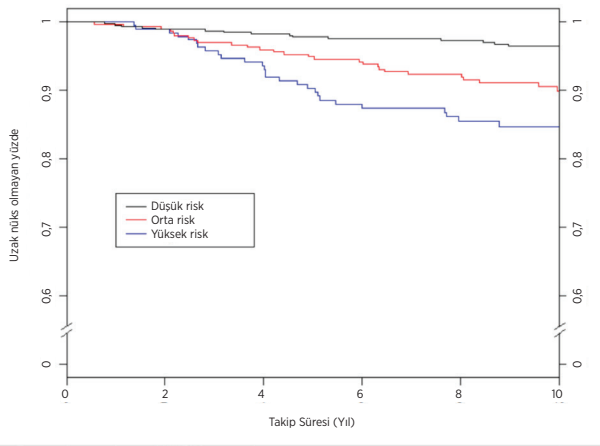
Şekil 34: Nod-Negatif Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS



Şekil 34 için Veri Özeti: Nod-Negatif Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	487 (%47)	15	%96,6 [%94,4 - %97,9]
Orta	335 (%32)	28	%90,4 [%86,3 - %93,3]
Yüksek	225 (%21)	32	%84,3 [%78,4 - %88,6]
Toplam	*1.047 (%100)*	*75*	

Şekil 35: HER2-Negatif Nod Negatif Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

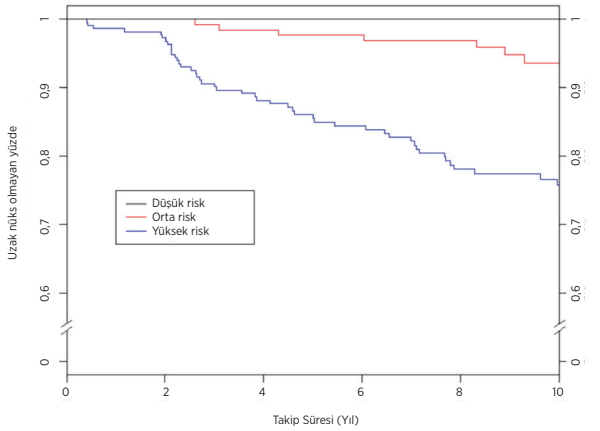


Şekil 35 için Veri Özeti: HER2-Negatif Nod Negatif Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

Risk Grubu	Broj bolesnika (%)	Broj događaja kroz 10 godina	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	474 (%48)	15	%96,5 [%94,3 - %97,9]
Orta	311 (%32)	27	%90 [%85,6 - %93,1]
Yüksek	199 (%20)	27	%84,7 [%78,4 - %89,3]
Toplam	*984 (%100)*	*69*	

Şekil 36, nod pozitif (1-3 nod) hastalar için risk grubuna göre Kaplan-Meier grafiklerini gösterir ve Şekil 37, nod pozitif (1-3 nod) HER2 negatif hastalar için aynı grafikleri gösterir. HER2-pozitif olan hastalarla veya onlarsız sonuçlar benzerdir.

Şekil 36: Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

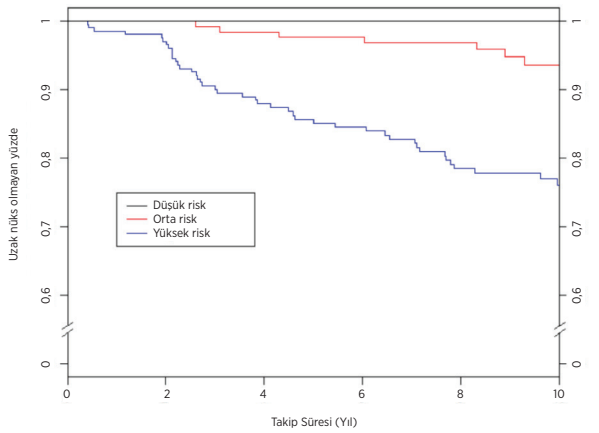


Şekil 36 için Veri özeti: Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	15 (%4)	0	%100 [%78,2 - %100]*
Orta	143 (%37)	7	%93,6 [%86,9 - %97]
Yüksek	224 (%59)	46	%75,8 [%68,9 - %81,4]
Toplam	*382 (%100)*	*53*	

* Clopper-Pearson Metodu Kullanılarak tahmin edilen Güven Aralığı

Şekil 37: HER2-Negatif Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS



Şekil 37 için Veri Özeti: HER2-Negatif Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için Risk Grubuna göre DRFS

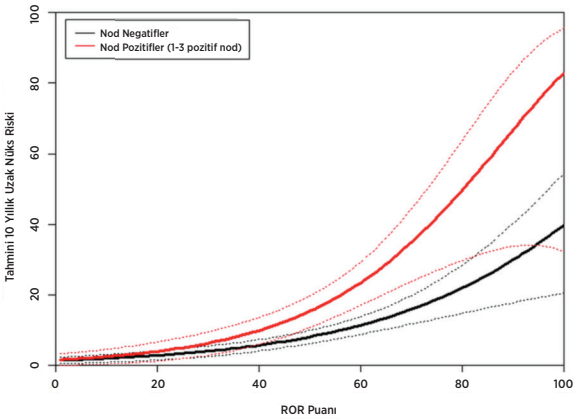
Risk Grubu	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Düşük	15 (%4)	0	%100 [%78,2 - %100]*
Orta	142 (%39)	7	%93,6 [%86,8 - %96,9]
Yüksek	210 (%57)	43	%76,1 [%69,0 - %81,8]
Toplam	*367 (%100)*	*50*	

* Clopper-Pearson Metodu Kullanılarak tahmin edilen Güven Aralığı

ROR ve Risk Tahmini Arasındaki İlişki

Şekil 38, nod-negatif ve nod-pozitif (1-3 nod) hasta gruplarının her biri için ayrı Cox orantılı zarar modellerine dayalı %95 güven aralıklarıyla ROR skorunun bir fonksiyonu olarak 10 yıllık DR riskini göstermektedir. Nod pozitif (1-3 nod) hastalar için, tüm aralık uyarlanırken orantılı riskler varsayımı ihlal edilmiştir. Nod pozitif (1-3 nod) hastalar için burada gösterilen eğri, orantılı zararlar varsayımının karşılandığı 0-80 aralığında ROR skorları olan nod pozitif (1-3 nod) hastaları kullanır.

Şekil 38: %95 Güven Aralıkları ile Nodal Kategoriye Göre On Yıllık Tahmini DR Riski



Her bir alt grup içinde, düşük risk kategorisine atanan hastaların mutlak klinik riski, yüksek risk kategorisine atanan hastaların mutlak klinik riskinden önemli ölçüde farklıdır.

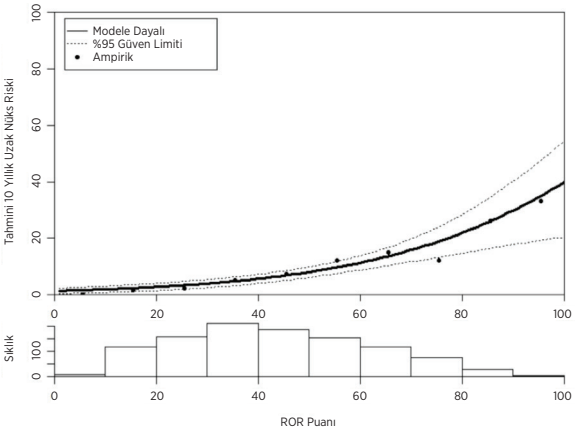
Tablo 34, Nod-Negatif hastaların 10 birimlik ROR kutularına göre dağılımını gösterir. Ayrıca 10 yıllık DR riski de gösterilmiştir.

Tablo 34: 10-birim ROR Aralığı ile Nod Negatif Hastaların Dağılımı

ROR Aralığı	Hasta Sayısı	Hasta Yüzdesi	10-yıllık DR Riski (Empirik)
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
Toplam	*1 047*	*%100*	

Şekil 39, her bir bölmenin 10 birim ROR aralığındaki (1-10, 11-20 vb.) tüm hastalardan oluştuğu 10 bölme için ampirik olarak tahmin edilen 10 yıllık sağkalım oranlarıyla birlikte Nod-Negatif hastalar için modele dayalı eğriyi gösterir). Eğrinin altında, kutuya göre frekans dağılımını gösteren bir histogram bulunur.

Şekil 39: Aşağıda Gösterilen ROR skorlarının Dağılımı ile Nod Negatif Hastalar için On Yıllık DR Riskinin Model Tabanlı ve Ampirik Tahminlerinin Karşılaştırılması



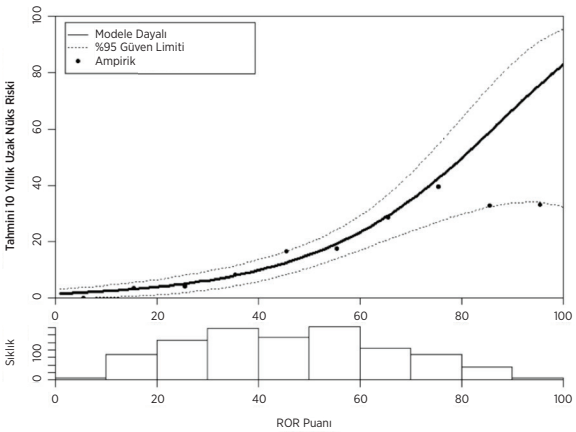
Nod-negatif hastalar için, orantılı risk modeline dayalı tahminler, tüm aralıktaki ampirik tahminlere benzerdir. Tablo 35, nod pozitif (1-3 nod) hastaların 10 üniteli ROR kutularına göre dağılımını göstermektedir. Ayrıca 10 yıllık DR riski de gösterilmiştir.

Tablo 35: 10-birimlik ROR Aralığına göre Nod-Pozitif (1-3 Nod) hastaların Dağılımı

ROR Aralığı	Hasta Sayısı	Hasta Yüzdesi	10-yıllık DR Riski (Empirik)
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
Toplam	*382*	*%100*	

Şekil 40, nod pozitif (1-3 nod) hastalarda her bir kutunun 10 ROR aralığındaki (1–10, 11–20, vb.) tüm hastalardan oluştuğu 10 kutu için modele dayalı eğriyi (ROR skorları ≤ 80 olan Nod-Pozitif (1-3 nod) hastaları kullanarak) ve ampirik olarak tahmin edilen 10 yıllık sağkalım oranlarını göstermektedir. Eğrinin altında, kutuya göre frekans dağılımını gösteren bir histogram bulunur.

Şekil 40: Aşağıda Gösterilen ROR skorlarının Dağılımı ile Nod Pozitif (1-3 Nod) Hastalar için On Yıllık DR Riskinin Model Tabanlı ve Empirik Tahminlerinin Karşılaştırılması



Hem Tablo 35 hem de Şekil 40, orantılı zararlar varsayımının başarısız olmasına yol açan ROR aralığının en üstünde gözlemlenen 10 yıllık riskin düzleşmesini göstermektedir. Bununla birlikte, 80'in üzerindeki iki kutudaki numune boyutlarının, nod pozitif (1-3 nod) hastalar için (81-90 arası 17 hasta ve 91-100 arası sadece 3 hasta) için küçük olduğuna dikkat edilmelidir.

Luminal A ve Luminal B İntrinsik Alt Tiplerin Karşılaştırılması

Çalışmadaki hastaların çoğunluğu (%96) ya Luminal A ya da Luminal B idi; hormon reseptörü pozitif hastalarda bu intrinsik alt tipler baskın olduğundan, bu, beklenmedik bir durum değildir.

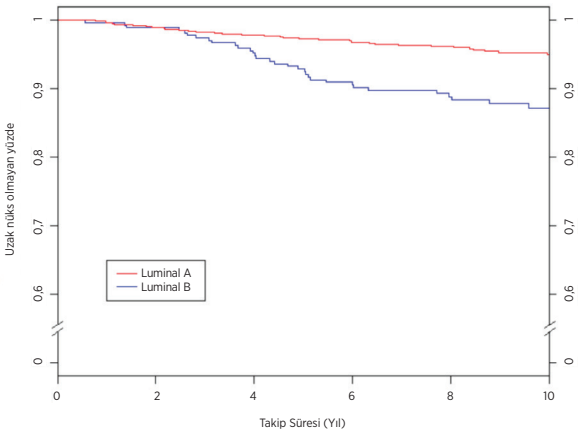
Tablo 36, Luminal A/Luminal B ayrımının CTS'nin ötesine eklediği DRFS için ek prognostik değeri göstermeye yönelik olasılık oranı testinin sonuçlarını göstermektedir. Tablo ayrıca Luminal A ile Luminal B hastalarını karşılaştıran risk oranını da gösterir. Her üç grupta da Luminal A hastaları için önemli ölçüde daha düşük uzak nüks riski vardır.

Tablo 36. Luminal Alt Tipler için DRFS Prognostik Değeri için Olasılık Oranı Testi

Alt Grup	Hasta Sayısı	Olay Sayısı	ΔLR χ^2	χ^2 p-değeri	Zarar Oranı LumA : LumB (%95 Güven Aralığı)
Tümü	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]

Şekil 41, Nod-Negatif hastalar için Luminal alt tipine göre DRFS karşılaştırmasını gösterir, Şekil 42, nod pozitif (1-3 nod) hastalar için aynı karşılaştırmayı gösterir. Her iki grup için, Luminal A ve Luminal B hastalarının DRFS'leri arasında anlamlı farklılıklar vardır.

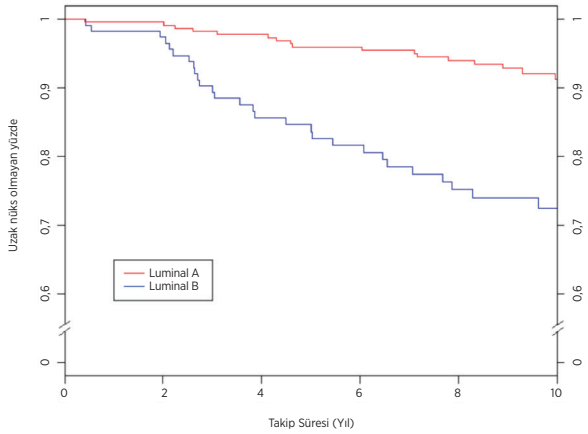
Şekil 41: Nod-Negatif Hastalar için İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri



Şekil 41 için Veri Özeti: Nod-Negatif Hastalar için İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Luminal A	725	32	%95,1 [%93,4 - %96,3]
Luminal B	284	32	%87,2 [%83,2 - %90,3]
Toplam	1 009	*64*	

Şekil 42: Nod-Pozitif (1–3 nod) Hastalar için İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri



Şekil 42 için Veri Özeti: Nod-Pozitif (1–3 nod) Hastalar için İntrinsik Alt Tipe göre DRFS için Kaplan Meier eğrileri

Risk Grubu	Hasta Sayısı	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
Luminal A	248	17	%91,3 [%87,2 - %94,2]
Luminal B	118	28	%72,5 [%64,2 - %79,1]
Toplam	366	*45*	

Tablo 37 nod negatif ve nod pozitif (1-3 nod) nodal gruplar için luminal alt tipe göre 10 yıllık RFS oranlarının bir tablosunu gösterir.

Tablo 37: Nodal Grup ve Luminal Alt Tipe göre On Yıllık RFS Oranları

Nod Durumu	Luminal Alt tip	Hasta Sayısı (%)	10 Yıl Boyunca Gerçekleşen Olay Sayısı	10 Yılda Uzak Nüks Olmaksızın Tahmini Yüzde [%95 Güven Aralığı]
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]

Nod negatif ve nod pozitif (1-3 nod) hasta popülasyonlarının her biri için Luminal A ve Luminal B hastaları arasındaki fark anlamlıdır.

Klinik Çalışma 2 Sonuçları

ROR'un hem sürekli bir ölçüm olarak dahil edildiğinde hem de önceden tanımlanmış üç risk grubu kullanılarak dahil edildiğinde standart klinik ve tedavi değişkenlerinin üzerine önemli prognostik bilgiler eklediği gösterilmiştir. Düşük risk grubunda, beklendiği gibi %90'ın oldukça üzerinde 10 yıllık DRFS vardır. Yüksek risk grubunda, beklenenden daha yüksek olan 10 yıllık DRFS %80'dir -%80'den gözle görülür şekilde düşük olması beklenmiştir. Risk gruplarını tanımlamak için kullanılan eşik değerler, mevcut kohorttan daha yüksek riskli olan ve beklenenden daha düşük riskli bir "yüksek risk grubu" na yol açan TransATAC kohortuna dayalıdır. ROR (sürekli ve risk grubuna dayalı), çeşitli alt gruplarda benzer prognostik bilgiler göstermiştir. Sürekli risk modeli, hem nod- negatif hem de nod-pozitif (1-3 nod) hasta popülasyonlarında ampirik nüks oranlarına yakından uyar. Çalışmadaki hastaların çoğunda (%96) iki lüminal alt tipten birinin (Luminal A veya Luminal B) tümörleri vardır. Tüm nod durum gruplarında, Luminal A/Luminal B ayrımı, DRFS ile ilgili prognostik bilgiler eklemiştir.

Kombine Klinik Çalışmalar Özeti

İki klinik doğrulama çalışmasında numuneler farklı laboratuvarlara gönderildiğinden ve bu laboratuvarlarda analiz edildiğinden, sonuçlar dağıtılmış kullanım için genelleştirilebilirdir. ROR'un, 10 yıllık DRFS için, hem sürekli bir ölçüm olarak dahil edildiğinde hem de önceden tanımlanmış üç risk grubu kullanılarak dahil edildiğinde standart klinik ve tedavi değişkenlerinin üzerine önemli prognostik bilgiler eklediği gösterilmiştir. Ek olarak, bir post-hoc analizde, ROR, tüm hastalar için standart klinik değişkenlerin üzerine 5 yıllık DRFS sonrası için önemli bilgiler eklemiştir. ROR (sürekli ve risk grubuna dayalı), çeşitli alt gruplarda benzer prognostik bilgiler göstermiştir. Sınırlı analizler de RFS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ROR sınıfları ayrıca farklı RFS'li üç risk grubu tanımlayabilmiştir. Her iki çalışma için, Luminal A ve Luminal B alt gruplarının DRFS'leri arasında nodal durumdan bağımsız olarak önemli farklılıklar vardır.

17 KAYNAKÇA

1. Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317–25.
2. Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Alt tips. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160–1167..
3. 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 Uzak Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783-90.
4. Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor pozitif breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222–5232..
5. Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458–471.
6. Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731–734.
7. 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.
8. Sestak I, et al. Prediction of Late Uzak Recurrence After 5 Years of Endocrine Tedavi: A Combined Analiz of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, TamoksifenAlone 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.
9. Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and Tamoksifenas adjuvant Tedavi for early-stYaş breast cancer: 10-year Analiz of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12):1135–41.
10. Dubsky PC, et al. Tamoksifenand 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.
11. Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Uzak Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Nod-Negatif and Nod-Pozitif Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829–1834.
12. Cuzick J, et. al. Prognostic Değer 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 Tamoksifento anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stYaş breast cancer: a meta-Analiz. Lancet Oncology 2006; 7(12): 991–996.

(c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting Uzak recurrence in receptor-pozitif 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 SEMBOLLER VE TANIMLAR

– Üretici

EC REP – Avrupa Birliği'nde Yetkili Temsilci

IVD – *İn vitro* tanı amaçlı tıbbi cihaz

– Kullanım Talimatlarına Bakın

– CE İşareti

LOT – Parti Kodu/Lot Numarası

REF – Katalog veya Referans numarası

– <n> test için yeterli miktarda içerir

– Sıcaklık aralığı depolama koşulları

– Sıcaklık depolama koşulları alt limiti

– Sıcaklık depolama koşulları üst limiti

– For Son Kullanma Tarihi

– Bu taraf yukarıya

Oda sck = Oda Sıcaklığı

HYB = Hibridizasyon

Mevzuata İlişkin Sorumluluk Reddi
İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir.

© 2023 Veracyte, Inc. ve bağlı şirketleri. Tüm hakları saklıdır. Veracyte, Veracyte logosu, Prosigna ve Prosigna logosu, Veracyte, Inc.'ın ve onun bağlı şirketlerinin ticari markalarıdır. nCounter, NanoString Technologies, Inc.'ın ticari markasıdır ve lisans altında kullanılmaktadır.

19 İLETİŞİM BİLGİLERİ

ABD İletişim Bilgileri:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080 ABD
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com

EC REP
AB'de Yetkili Temsilci:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Küresel İletişim Bilgileri:
Teknik Destek e-posta: DxSupport@Veracyte.com
Ürün Bilgilendirme e-posta: info@prosigna.com
Websitesi: www.prosigna.com