

Csomag melléklete
**Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
(Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje)**


1–10 teszt

Verzió: 01, létrehozva: 2023-07

Tárolási feltételek

-20 °C Tárolja legalább -20 °C-on	Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) kazetták
-80 °C Tárolja legalább -80 °C-on	Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) CodeSet
+25 °C +15 °C Tárolja szobahőmérsékleten	Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) előkészítő csomag
+8 °C +2 °C Tárolja +4 °C-on	Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) előkészítő tálcák

TARTALOMJEGYZÉK

1	JAVALLOTT HASZNÁLAT / RENDELTETÉS	1
2	A TESZTRENSZER ÖSSZEFOGLALÁSA	1
2.1	Az nCounter elemző rendszer működési elve	2
2.2	A Prosigna algoritmusának kimenetszámítási elvei	2
3	A KÉSZLETBEN TALÁLHATÓ REAGENSEK ÉS BERENDEZÉSEK	2
3.1	A Prosigna készlet áttekintése	2
3.2	Prosigna készlet tartalma 1, 2, 3, 4 vagy 10 tesztes	3
3.2	Prosigna készlet esetén	3
4	FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÖVINTÉZKEDÉSEK	3
5	A TESZTTEL KAPCSOLATOS ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ	3
5.1	A szövet feldolgozása	3
5.2	A Prosigna teszt végrehajtása	4
6	KÉPZÉSI INFORMÁCIÓ	4
7	HULLADÉKKEZELÉS	4
8	TÁROLÁS ÉS KEZELÉS (REAGENSEK)	4
9	A PROSIGNA SZÁMÁRA SZÜKSÉGES BERENDEZÉSEK	4
10	SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETBEN NEM TALÁLHATÓ REAGENSEK ÉS BERENDEZÉSEK	4
10.1	Anyagok	4
10.2	Felszerelés	4
10.3	A berendezés specifikációja	4
11	MINTA GYŰJTÉSE ÉS FELDOLGOZÁSA	5
11.1	Szövetmintára vonatkozó követelmények és patológiai felülvizsgálat	5
11.2	Minta gyűjtése és tárolása	5
11.3	A tárgylemez előkészítése	5
11.4	A tárgylemez feldolgozása	5
11.5	Az RNS izolálása	6
11.6	Az RNS koncentrációjának és minőségének mérése	6
11.7	A tesztelési eljárás	7
12	HIBAELHÁRÍTÁS ÉS TESZTHIBÁK	9
13	A TESZT EREDMÉNYEI	9
13.1	Intrinzik altípusok	9
13.2	ROR-pontszám	10
13.3	10 éven belüli, távoli kiújulás valószínűsége	10
13.4	Kockázati besorolás	10
13.5	Minőség-ellenőrzés	10
14	AZ ELJÁRÁSOKKAL KAPCSOLATOS KORLÁTOZÁSOK	10
15	VÁRHATÓ ÉRTÉKEK	11
15.1	ROR-tartomány altípusok szerint	11

15.2	Az ROR-pontszámok gyakorisága csomóállapotonként	11
15.3	Távoli kiújulástól mentes túlélés kockázati kategóriáinként	11
16	TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK	12
16.1	Az elemzés pontossága és reprodukálhatósága	12
16.2	Érzékenység / RNS-bemenet	13
16.3	Interferencia tesztelése	13
16.4	Klinikai teljesítmény	14
17	BIBLIOGRÁFIA	25
18	SZIMBÓLUMOK ÉS MEGHATÁROZÁSOK	26
19	ELÉRHETŐSÉGEK	26

1 JAVALLOTT HASZNÁLAT /RENDELTETÉS

A Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna® emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) egy olyan *in vitro* diagnosztikai teszt, amely az emlőrákszövetben található sejtek genetikai profiljának használatával méri fel az adott páciensnél a későbbi kiújulás kockázatát. A teszt a génexpressziós profilt méri formalinban fixált, paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded – FFPE) emlőrákszövetből kinyert RNS használatával. A génexpressziós adatokat klinikai változókkal együtt súlyozva generál altípust (luminális A, luminális B, HER2-dúsított vagy bazális szerű) és pontszámot, amely jelzi a betegség későbbi kiújulásának valószínűségét. A tesztet az nCounter® elemző rendszerben kell végrehajtani korábban invazív emlőrákként diagnosztizált FFPE emlőtumorszövet használatával.

A Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) olyan emlőrákos nő betegek számára készült, akik mastectomián vagy emlőmegtartó terápián estek át az alábbiak egyikének megfelelő lokoregionális kezeléssel együtt:

- 10 éves, távoli, kiújulásmentes túlélés prognosztikus indikátora menopauza utáni, hormonreceptor-pozitív (HR+), nyirokcsomó-negatív, I-es vagy II-es stádiumú emlőrákban szenvedő nőknél, amelyet csak adjuváns endokrin terápiával kell kezelni más klinikopatológiai tényezőkkel együtt használva.
- 10 éves, távoli, kiújulásmentes túlélés prognosztikus indikátora menopauza utáni, hormonreceptor-pozitív (HR+), nyirokcsomó-negatív (1–3 pozitív csomó, illetve 4 vagy több pozitív csomó), I-es vagy IIIA stádiumú emlőrákban szenvedő nőknél, amelyet csak adjuváns endokrin terápiával kell kezelni más klinikopatológiai tényezőkkel együtt használva.

2 A TESZTRENSZER ÖSSZEFOGLALÁSA

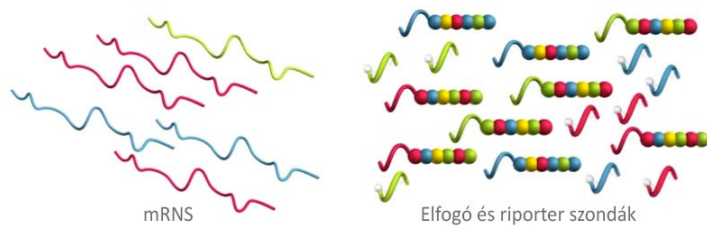
Az nCounter elemző rendszer a génexpresszió közvetlen, multiplex mérését teszi lehetővé az mRNA (hírvívó RNS) transzkriptek relatív bőségének digitális kiolvasásával, amely az alábbi lépésekkel hajtható végre: 1) az RNS hibridizációja fluoreszkáló riporter szondákra és elfogó szondákra, 2) a cél-/szonda komplexek purifikálása hibridizáció utáni feldolgozáshoz és az nCounter előkészítő állomáson található nCounter kazettára rögzítéshez szükséges reagenst tartalmazó nCounter előkészítő tálcák használatával, és 3) az nCounter kazetta elemzése az nCounter digitális elemzőben teszteredmények előállításához¹. Az elfogó és a riporter szonda egyaránt egyedi DNS-szondaszekvenciát tartalmaz a cél hibridizálásához és purifikálásához. Az elfogó és a riporter szonda a pozitív és a negatív vezérlőkkel együtt alkotja a CodeSetet. A Prosigna egyidejűleg méri az intrinzik altípus-osztályozási algoritmusához² használt 50 gén, jelnormalizáláshoz használt 8 háztartási gén, 6 pozitív vezérlő és 8 negatív vezérlő expressziós szintjét egyetlen hibridizálási reakció során, specifikusan ezekhez a génekhez tervezett nukleinsavszondákkal. A Prosigna készletében megtalálható továbbá egy referenciaminta, amely mind az 58 gén *in vitro*, leírt RNS-célját tartalmazza. A referenciamintát a beteg RNS-mintáinak minden tételével tesztelik a futás minősítése és egyes gének jelének normalizálása céljából.

A Prosigna tesztet a FFPE emlőtumorszövetből izolált RNS-en kell elvégezni. Patológusnak kell megvizsgálnia a hematoxilinnel és eozinnal (H&E) festett tárgylemezt, valamint azonosítania kell (és meg kell jelölnie) a teszthez megfelelő invazív emlőrák területét. A patológusnak továbbá meg kell mérnie a tumor felületét, amely alapján meghatározható a teszthez szükséges nem festett tárgylemezek száma és a tumor cellularitása a teszthez megfelelő tumorszövet jelenlétének biztosításához. Egy képzett technikusknak makrodisszekcióval fel kell tárnia e területet a festetlen tárgylemezekre és H&E festett tárgylemezekre megjelölt tumorterületnek megfelelően, és izolálnia kell az RNS-t a szövetből. Az izolált RNS-t azután tesztelni kell az nCounter elemző rendszerrel teszteredmények (többek között az intrinzik altípus, a kiújulási kockázati (Risk of Recurrence, ROR) pontszám és a kockázati kategória) előállításához.

2.1 Az nCounter elemző rendszer működési elve

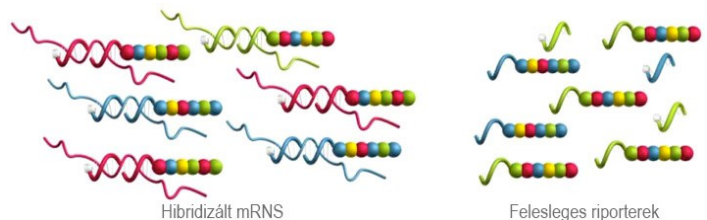
Az nCounter elemző rendszer génspecifikus szondapárokat (1. ábra) használ, amely közvetlenül az oldatban található mRNA-mintába hibridizál, kiküszöbölve ezzel az eredményeket esetlegesen tévesen befolyásoló enzimatis reakciókat. A teszt első lépésében a DNS-szondákat közvetlenül az oldatban lévő RNS-minta 70–100 alappárrégiójába hibridizálják. A fluoreszkáló riporter szonda 35–50 alapszonda-szekvenciából áll, amely az mRNA céljának és egy egyedi gerinc DNS-szekvencia kiegészítője, amely a négy fluoreszkáló színezék egyikének címkéjével ellátott RNS-szegmensekbe hibridizál: piros (R), sárga (Y), kék (B) vagy zöld (G). A fluoreszkáló szegmensek hat pozíció/négy színű fluoreszkáló „színkódot” alkotnak, amely minden cél esetében egyedi. Egy különálló elfogó szonda 35–50 alapszonda-szekvenciából áll, amely az mRNA céljának és biotinjának kiegészítője, amelyet rögzítéshez használnak streptavidin bevonatú tárgylemezen.

1. ábra: CodeSet hibridizálása mRNA-ra

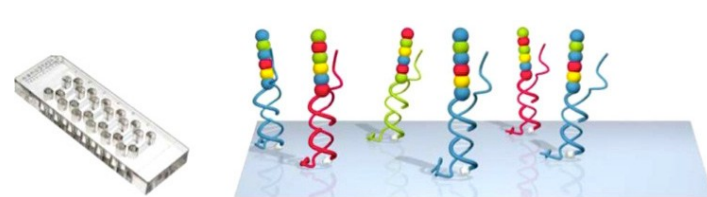


A hibridizálás után a minta purifikálási lépései automatikusan hajtódnak végre az nCounter előkészítő állomáson. A rendszer először eltávolítja a felesleges elfogó és riporter szondákat (2. ábra) egymás utáni mágneses gyöngyös rögzítési lépésekkel a szonda-cél komplexek nCounter kazetta felületének véletlenszerű helyére kötésével streptavidin-biotin kapcsolódással (3. ábra). Végül igazítja és rögzíti a szonda/cél komplexeket (4. ábra) az nCounter kazettán.

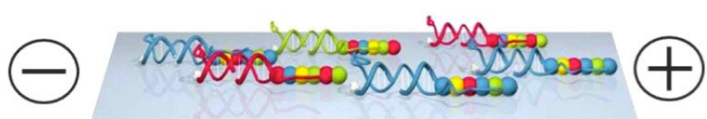
2. ábra: Felesleges riporter eltávolítása



3. ábra: Hibridizált riporter kötése a kazetta felületére



4. ábra: Hibridizált riporter igazítása és rögzítése



A minta feldolgozása után a kazettát az nCounter digitális elemzőbe kell helyezni adatgyűjtés céljából. Minden érdeklődésre számot tartó célmolekulát a hozzárendelt riporter szondán található hat sorrendbe rendezett fluoreszkáló pont által létrehozott „színkód” azonosít. A kazetta felületén található riporter szondákat ezután meg kell számolni, majd táblázatba kell rendezni minden célmolekula esetében, majd fel kell dolgozni az algoritmussal (5. ábra).

5. ábra: Adatgyűjtés

Kód	Gén	Darabszám
●●●●●	x	3
●●●●●	y	1
●●●●●	z	2

2.2 A Prosigna algoritmusának kimenetszámítási elvei

A teszt az eredetileg PAM50² elnevezésű, meghatározott 50 génes osztályozási algoritmuson alapul, és az nCounter elemző rendszeren formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) emlőtumor-szövetmintákból kivonatolt RNS használatával kell elvégezni. Az algoritmus 50 génes expressziós profilt használ az emlőrák besorolásához az alábbi négy molekuláris osztály vagy intrinzik altípus egyikébe: Luminális A, Luminális B, HER2-dúsított és Bazális szerű². A négy intrinzik altípusba tartozó prototipikus genetikai profilokat (például centroid) az nCounter elemző rendszeren átalakították több észak-amerikai klinikai helyszínen gyűjtött FFPE emlőtumorminták felhasználásával. Miután végrehajtotta a tesztet egy beteg tesztmintáján, egy Pearson-féle korreláción alapuló számítási algoritmus összehasonlítja a beteg tesztmintájának normalizált 50 génes expressziós profilját a négy emlőrák intrinzik altípus prototipikus expressziós profiljaival. A beteg tesztmintáját a legmagasabb Pearson-féle korrelációval rendelkező altípusba sorolja.

Az algoritmus továbbá meghatározza a kiújulási kockázati (ROR) pontszámot 0–100 skálán³, amelyet korrelál a hormonreceptor-pozitív, korai stádiumú emlőrákban szenvedő, menopauza utáni nők tíz éves távoli kiújulási valószínűségével⁴. A jelentés a kockázati kategóriát (alacsony, közepes, magas) is meghatározza. Az ROR-pontszámot a rendszer egy Cox-modellből származó együttthatókkal számítja, amely az 50 gén 46 génes alcsoportjának Pearson-féle korrelációját tartalmazza minden intrinzik altípus centroid esetében, valamint a terjedési pontszámot és a tumor bruttó méretét. A tesztváltozókat a rendszer megszorozza a Cox-modellből származó megfelelő együttthatókkal a pontszám meghatározásához, amelyet azután elhelyez a 0–100 skálán a FFPE emlőtumorminták képzési készletéből generált együttthatók alapján. A kockázati kategóriák meghatározásához a rendszer felhasználja továbbá az ROR klinikai validációs vizsgálatban használt határértékeit (cut-off).

3 A KÉSZLETBEN TALÁLHATÓ REAGENSEK ÉS BERENDEZÉSEK

3.1 A Prosigna készlet áttekintése

A Prosigna készlet – a rendelt terméktől függően – 1, 2, 3, 4 vagy 10 betegminta feldolgozásához elegendő reagenst tartalmaz. A rendelési adatokat lent találja. A Prosigna készletben megtalálható egy CodeSet, egy referenciaminta-cső minden egy és tíz közötti tesztből álló készlethez, valamint fogyóeszközök, amelyek teljesítményét az értékesítés előtt együtt tesztelik.

Katalógusbeli szám	Tesztek száma a készletben	A készletben található referenciaminta-csővek
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Javasolt a Roche FFPET RNS-izolációs készlettel (Roche-FFPET-025) vagy a Veracyte FFPE RNS-extrakciós készlettel (550100) együtt használni. Mindkét RNS-extrakciós készlet kizárólag a Veracyte cégtől szerezhető be.

3.2 Prosigna készlet tartalma 1, 2, 3, 4 vagy 10 teszt Prosigna Kit esetén

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

Contents Description

Prosigna CodeSet

Prosigna Reporter CodeSet	buffer, nucleic acids with fluorescent dyes
Prosigna Capture ProbeSet	buffer, nucleic acids
Prosigna RNA Reference Sample	buffer, nucleic acids
CodeSet Barcode Sticker	sticker sheet
Test Configuration Code	card with sticker

Prosigna Prep Plates

Prep Plates	superparamagnetic beads, buffer, salts, oligonucleotides, polystyrene beads containing fluorescent dyes
-------------	---

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)	sample cartridge(s)
-----------------------	---------------------

Prosigna Prep Pack

nCounter Hybridization Buffer	buffer, salts
12-Well Notched Strip Tubes	plastic strips
12-Well Notched Strip Tube Lids	plastic lids
nCounter Prep Station Tips	2 racks of 90 tips + 6 piercers
nCounter Cartridge Adhesive Cover	nCounter adhesive films
nCounter Tip Sheaths	6-well tip holders

4 FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. Kizárólag *in vitro* diagnosztikai használatra.
2. Ezt a tesztet rendkívül összetett molekuláris biológiai technikákban jártas operátornak kell elvégeznie a helyi jogszabályok betartásával.
3. A különböző Prosigna készletek alkotórészeit ne keverje. A Prosigna készletek funkcionálitása csak a kapott kombinációban biztosítható, mivel a gyártás során így minősítették azokat.
4. A maradék reagenseket ne használja újra a Prosigna teszthez.
5. Ha a hibridizáció ideje veszélyesen hosszú vagy a hőmérséklete veszélyesen magas, állítsa le a reakciót.
6. Fontos fenntartani a minta felügyeleti láncának (szövet-RNS és RNS-teszt) integritását annak biztosítása érdekében, hogy a beteg mintájának azonosítóját a megfelelő teszteredményhez rendelik.
7. Ha a reagenseket nem sikerül a címkén olvasható körülmények között tárolni, az hátrányos hatással lehet a teszt teljesítményére.
8. A reagensek és minták kezeléséhez mindig használjon kesztyűt.
9. Kerülje az RNase szennyezést, amely negatív hatással lehet az eredmények minőségére.
10. Minden biológiai mintát és anyagot úgy kell kezelni, mintha fennállna a fertőző ágensek átadásának lehetősége, és megfelelő óvintézkedések mellett, a szövetségi, az állami és a helyi jogszabályoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
11. Soha ne pipettálja szájjal.

12. Kerülje a reagens szemmel, bőrrel és nyálkahártyával való érintkezését.
13. Alkalmazza a molekuláris laboratórium legjobb gyakorlatát a tesztminták közötti kereszt-szennyeződés, illetve a magas koncentrációjú nukleinsav célokkal (szintetikus vagy PCR-amplifikált) való szennyeződés elkerülése érdekében, mert az negatív hatással lehet az eredmények minőségére.
14. A feldolgozás után a Prosigna előkészítő tálcán és az nCounter kazettákon nagyon alacsony szintű (< 0,1%) nátrium-azid található, ezért javasolt műanyag (nem fém) hulladéktartályt használni az ártalmatlanításhoz. Bár a Prosigna esetében rendkívül valószínűtlen, a nátrium-azid fém felhalmozódva robbanásveszélyes.
15. Továbbiberendezésspecifikus ártalmatlanítási információt az nCounter elemző rendszer használati útmutatójában és az előkészítő állomás és a digitális elemző szervizelési útmutatójában talál.
16. A riportert CodeSet, az elfogó ProbeSet, a hibridizációs puffer és az előkészítő tálca anyagbiztonsági adatlapjának információi a www.prosigna.com webhelyen találhatók.
17. Minden veszélyes anyagot az intézmény veszélyes anyagok ártalmatlanítására vonatkozó útmutatásának megfelelően kell ártalmatlanítani.
18. A nem használt CodeSetet ki kell dobni.
19. Ha a beteg tumorának méretkategóriáját helytelenül írja be a szoftverbe, az hátrányos hatással lehet az ROR-pontszámra és a kockázati besorolásra (például az ROR-pontszám eltolódhat és/ vagy a besorolás téves lehet).
20. Ha a beteg csomóállapotát helytelenül írja be a szoftverbe, a beteg teszteredményeit a rendszer helytelenül határozhatja meg (például helytelen lehet a kockázati besorolás).
21. A Prosigna teszthez ne használjon nem megfelelő minőségű vagy mennyiségű RNS-t, illetve nem megfelelő felületű vagy cellularitású tumormintát. Előfordulhat, hogy a Prosigna teszt ebben az esetben érvénytelen eredményt ad, és a teszt sikertelenségét jelzi.

5 A TESZTTEL KAPCSOLATOS ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

1. A teszt csak formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), sebészeti úton kimetszett emlőrák-szövetmintán történő használatra készült. Friss, fagyasztott vagy nem emlőrákszöveten nem használható.
2. A teszt végrehajtásához szükség van a beteg elsődleges tumorának bruttó méretére és csomóállapotára.
3. A reagensek és a minták feldolgozás során történő mikrobiális és nukleáz szennyeződésének megelőzése érdekében használjon steril, eldobható mikropipettahegyet.
4. Amikor az izolált RNS-mintákat aktívan nem manipulálja, tárolja nedves jégen.
5. A hőblokkokhoz kalibrált hőmérők szükségesek.
6. Ha a készlet sérült, ne használja annak alkotóelemeit.
7. A Prosigna tesztet használó laboratóriumoknak javasolt klinikai ellenőrzéseket (például a kockázati kategória meghatározásához) kifejleszteniük és alkalmazniuk az eredmények pontosságának biztosítása érdekében az idő előrehaladtával, a laboratórium szabványos minőség-ellenőrzési eljárásainak részeként.

5.1 A szövet feldolgozása

1. Amennyiben a szövet feldolgozása során makrodisszekcióval nem sikerül megfelelően eltávolítani a környező nem tumoros/normál szövetet, az a kockázat alulbecslését eredményezheti az orvosnak jelentett alacsonyabb ROR-pontszám miatt.
2. Ha az emberi genomális DNS-t az RNS izolációja során nem sikerült megfelelően eltávolítani, az a teszt alacsonyabb jele miatt magasabb hibaarányt vagy az orvosnak jelentett magasabb ROR-pontszám miatt túlbecsült kockázatot eredményezhet.
3. Mindenfestetlen szövetrésztapozítív töltésű mikroszkóptárgylemezre kell rögzíteni a szövet feldolgozása során történő leválás elkerülése érdekében.
4. Több tárgylemezt igénylő minták esetében az összes tárgylemezt egyszerre kell feldolgozni.
5. A tárgylemezre rögzített szövetrészek minősége romolhat, ha azokat 9 hónapnál tovább tárolja száraz környezetben.
6. A szennyeződés megelőzése érdekében cseréljen 3% glicerint munkaidőt hetente vagy ha az oldat zavarossá válik.
7. A szövetminőség romlásának megelőzése érdekében 4 tárgylemezecsoport feldolgozása után cserélje ki az első D-limonén mosó tartalmát, majd 8 tárgylemezecsoport feldolgozása után az etanol (EtOH) és a második D-limonén festőedény tartalmát.
8. A tumorról érintett terület körvonalának festetlen tárgylemezen történő kijelölésekor és a tumorról nem érintett szövet eltávolításakor legyen körültekintő: a tumoros szövetet ne érintse.

- A makrodisszekció során az éles eszközöket körültekintően használja.
- Minden feldolgozott szövetmintához használjon újborotvapengét.
- A 10%-os SDS szobahőmérsékleten gyakran kicsapódik, ezért 37 °C-ra kell melegíteni, amely hőmérsékleten a kicsapódás megszűnik.*
- Az RNS-izolációs készletek új tételeit tesztelni kell az izolációs készlet specifikációjának megfelelően annak meghatározásához, hogy az új készlet alkalmas-e beteg tesztelésére (részleteket a 11.5 szakaszban talál).

* A szükséges 10%-os SDS nem része a Roche FFPET RNS-izolációs készletnek.

5.2 A Prosigna teszt végrehajtása

- Győződjön meg arról, hogy a beteg kategorikus elsődleges bruttó tumorméretét helyesen adta meg a szoftverben.
- Győződjön meg arról, hogy a beteg kategorikus csomóállapotát helyesen adta meg a szoftverben.
- Ellenőrizze, hogy a hibridizáláshoz szükséges, fűtött fedéllel rendelkező hőblokk megfelel-e a specifikációnak, és rutinszerűen kalibrálva van.
- Csak a Prosigna készletben kapott fogyóeszközöket használja. Ezeket kifejezetten az nCounter előkészítő állomáson és az nCounter digitális elemzőben való használatra tervezték.
- Ha a hibridizációs puffert alacsony hőmérsékleten tárolták, és kicsapódás észlelhető, melegítse a csöveket 37 °C-ra, amely hőmérsékleten a sók kicsapódása megszűnik.
- A teszthez szükséges alkotóelemeket ne keverje túl nagy lendülettel, mert az a reagensek károsodását okozhatja. A keverést pipettával végezze.
- A riporter CodeSetet 3000 × g-nél nagyobb sebességgel ne centrifugálja 10 másodpercnél tovább. A centrifugáláshoz ne használja az „impulzus” beállítást. Ha ezt teszi, a CodeSet kicsapódhat.
- A hibridizációs reakciókat tartsa 65 °C-on, amíg azok készen állnak az előkészítő állomásba helyezésre. Ha a hőblokkot 4 °C-ra hűtésre állítja be, vagy ha a hibridizálás végén a mintákat jégre helyezi, az kereszthibridizálást eredményezhet, amely veszélyeztetheti a teszt eredményeit.
- Ha a csősorokat nem sikerül 65 °C-ra melegíteni az elfogó ProbeSet hozzáadását követő 15 percen belül, az kereszthibridizálást eredményezhet, amely veszélyeztetheti a teszt eredményeit.
- Ha az előkészítő állomáson a feldolgozást nem sikerül megkezdeni a minták 65 °C-os környezetből történő eltávolítását követő 15 percen belül, az kereszthibridizálást eredményezhet, amely veszélyeztetheti a teszt eredményeit.
- Mielőtt a hőblokkban hibridizálást végez, győződjön meg arról, hogy a csősorok sapkája erősen le van zárva, így megelőzheti a párolgást, amely veszélyeztetheti a teszt eredményeit.

6 KÉPZÉSI INFORMÁCIÓ

Ezt a tesztet rendkívül összetett molekuláris biológiai technikákban jártas, professzionális operátornak kell elvégeznie a helyi jogszabályok betartásával. A Prosigna teszt futtatásával kapcsolatos képzési információért forduljon a Veracyte céghez.

7 HULLADÉKKEZELÉS

Az IVD-alkalmazások során használt reagensek és berendezések hulladékkezelésével kapcsolatos részleteket az nCounter elemző rendszer használati útmutatójában talál.

A hulladékkezeléssel kapcsolatos információkért és az RNS-extrakciós reagensekre vonatkozó részletekért lásd a választott RNS-extrakciós készlet használati utasítását.

8 TÁROLÁS ÉS KEZELÉS (REAGENSEK)

A tesztkészlet minden alkotóelemének lejárati dátuma megtalálható a CodeSet dobozán található vonalkódcímkén és minden Prosigna alkotóelem külső dobozának címkéjén.

- A Prosigna CodeSet doboz alkotórészeit (Prosigna riporter CodeSet, Prosigna elfogó ProbeSet és Prosigna RNS-referenciamenta) -80 °C-os vagy alacsonyabb hőmérsékleten kell tárolni.
- Az nCounter kazettákat -20 °C-os vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten kell tárolni.
- Az nCounter előkészítő tálcákat 4 °C-on (2–8 °C) kell tárolni.
- Az nCounter előkészítő tálcákat szobahőmérsékleten (15 °C–25 °C) kell tárolni.

9 A PROSIGNA SZÁMÁRA SZÜKSÉGES BERENDEZÉSEK

- nCounter elemző rendszer (katalógusszám: NCT-SYST-DX) (a lenti két berendezést tartalmazza)
 - nCounter előkészítő állomás 5s (katalógusszám: NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter digitális elemző 5s (katalógusszám: NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)
- További információt az nCounter elemző rendszer használati útmutatójában talál.

2023-07 LB-0036-01

10 SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETBEN NEM TALÁLHATÓ REAGENSEK ÉS BERENDEZÉSEK

10.1 Anyagok

- FFPE RNS-izolációs készlet (ha nem a Veracyte cégtől beszerzett Roche FFPET RNS-izolációs készletet vagy Veracyte FFPE RNS-extrakciós készletet használ, olvassa el a 11.5 szakaszt az izolációs készlet követelményeivel kapcsolatban)
- Hematoxilin és eozin (H&E)
- Pozitív töltésű üveg mikroszkóptárgylemezek
- D-limonén tisztítószer (szöveti minőség)
- 100% etanol (abszolút), ACS vagy annak megfelelő minőségű (legalább 99,5%)
- Glicerín, molekuláris biológiai minőség
- Nukleázmentes víz, molekuláris biológiai minőség^{1,2}
- 10% SDS, molekuláris biológiai minőség¹
- 100%-os izopropanol²
- 50 ml-es kúpos cső²
- Borotvapengék (vagy eldobható szikék)
- Eldobható mikrotóm pengék
- 0,5 ml csavaros kupak¹ és 1,5 vagy 1,7 ml-es tapadásmentes RNase-mentes mikrocentrifugacső
- RNase-mentes mikropipettahegyek aeroszolgátlóval

¹ Szükséges, de a Roche FFPET RNS-izolációs készlet használatával végzett RNS-extrakcióhoz nem biztosított anyagok.

² Szükséges, de a Veracyte FFPE RNS-extrakciós készlet használatával végzett RNS-extrakcióhoz nem biztosított anyagok, mely anyagok a Veracyte készlet használati utasításában is szerepelnek.

10.2 Felszerelés

- Mikrotóm
- Vízfürdő (40 °C)
- Tárgylemez-melegítő (45 °C)
- Mikroszkóptárgylemez-száritó tartó
- Mikropipetták; 2 µl, 20 µl, 200 µl és 1000 µl
- Mini-centrifuga 0,2 ml-es csősorrotorral és szabványos 1,5/2,0 ml-es mikrocentrifugacső-rotorral
- Szabványos asztali mikrocentrifuga rögzített szögű rotorral, amely 1,5 ml-es centrifugacsövekkel
- Négyszögletes üveg festőedények fedéllel (hozzátétolagos belső méret: 3,6 × 2,8 × 2,4" (91 × 71 × 60 mm)); 3 db szükséges
- Tárgylemeztartó (legfeljebb tíz 3" × 1" (75 × 25 mm) méretű üveg tárgylemezhez)
- Száraz hőblokk, nem hordozható*
- Asztali keverő mikrocentrifugacsövekhez
- Mérőhenger (javasolt méret: 100–250 ml)
- Disszekciós tű vagy fedő/tárgylemez csipesz (hajlított, nem fogazott)
- Kalibrált hőmérők (az 55 °C–80 °C tartományban mér)
- Mikrotérfogató UV/Vis spektrofotométer (lásd a lenti specifikációt)
- Hőblokk fűtött fedéllel (lásd a lenti specifikációt)
- Centrifuga mikrolemesz-adapterrel (lásd a lenti specifikációt)
- Coplin-féle edény

* A Roche FFPET RNS-izolációs készlettel és a Veracyte FFPE RNS-extrakciós készlettel végzett RNS-extrakcióhoz szükséges felszerelés.

10.3 A berendezés specifikációja

1. táblázat: Teljes spektrumú mikrotérfogató UV/Vis spektrofotométer nukleinsav mennyiségének méréséhez

Tervezési jellemző	Specifikáció
Minta térfogattartománya	1–2 µl
Út hossza	1 mm
Hullámhossz tartománya	260–280 nm
Hullámhossz pontossága vagy hibája	± 1 nm
Spektrális felbontás vagy sávszélesség	Legfeljebb 4 nm
Abszorpciós pontosság vagy véletlen fotometriai hiba	0,003 (1 mm-es út)
Érzékelési korlát	5 ng/µl RNS
Maximális koncentráció	≥ 1000 ng/µl RNS

2. táblázat: Mikrotérfogató fotodiódás UV/Vis spektrofotométer nukleinsav mennyiségének méréséhez

Tervezési jellemző	Specifikáció
Minta térfogattartománya	1–2 µl
Út hossza	0,5 mm
Hullámhossz tartománya	260 és 280 nm
Spektrális felbontás	Legfeljebb 8 nm
Abszorpciós pontosság	3% (1,05 Abs 260 nm esetében)
Érzékelési korlát	4 ng/µl RNS
Maximális koncentráció	≥ 1000 ng/µl RNS

3. táblázat: Hőblokk fűtött fedéllel teszt hibridizálásához

Tervezési jellemző	Specifikáció
Hőblokk kialakítása	- Illeszkednie kell a normál profilú (12 × 0,2 ml-es) jelöléses csősorokhoz, amelyek nCounter előkészítő csomag részét képezik. - Az alacsony profilú (LP) és a magas profilú (HP) csövekhez tervezett hőblokkok nem kompatibilisek (a termociklus esetében a másik elnevezése: „gyors” blokk). - A más típusú csövekhez (például 0,1 ml-es csövek, 1,5 ml-es csövek) tervezett hőblokkok nem kompatibilisek. - Programozhatónak kell lennie a 65 °C-os hőmérséklet megtartására. - A hőmérsékletet ± 1 °C és 65 °C közötti értéken kell tartania.
Fűtött fedél kialakítása	- Fix és állítható magasságú fedél is elfogadható. - A fedélnek 70 °C-os hőmérsékletre programozhatónak kell lennie.

4. táblázat: Centrifuga mikrolemzettartóval nCounter előkészítő tálcák forgatásához

Tervezési jellemző	Specifikáció
Centrifugálási sebesség	Legalább 2000 × g
Rotorok	4 × 750 ml lengőlapátos rotor mikrolemzettartókkal (vagy azzal egyenértékű) SBS-formátumú 96 mélyedéses mikrolemmezhez
Üzem módok	Gyorsítási/lassítási üzemmód

11 MINTA GYŰJTÉSE ÉS FELDOLGOZÁSA

11.1 Szövetmintára vonatkozó követelmények és patológiai felülvizsgálat

- A Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) tesztet formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), hormonreceptor-pozitív emlőtumoros szövetmintán kell elvégezni, amelyet egy patológus az invazív emlőrák alábbi típusainak egyikébe sorolt:
 - Invazív ductális karcinóma
 - Invazív lobuláris karcinóma
 - Invazív karcinóma ductális és lobuláris jellemzőkkel („vegyes típusú karcinóma”)
 - Nem speciális típus (NST) vagy külön megjelölés nélkül (NOS)
- Egy patológusnak ki kell jelölnie a teszthez az FFPE tumorblokkot a legnagyobb életképes invazív emlőrákkal.
- A teszthez festetlen tárgylemezhez rögzített szövetrészek szükségesek a feldolgozáshoz és egy megfelelő H&E festett tárgylemez az FFPE tumorblokkból.
- Javasolt a tesztfeldolgozáshoz kiválasztott szövetrészeket a H&E festéshez kivágott szövetrésszel szomszédos részről kivágni, így biztosítva, hogy a H&E festett tárgylemezen azonosított tumorterület megfelel a festetlen tárgylemezeken lévő tumorterületnek.
- Egy patológusnak be kell karikázni az életképes invazív emlőrák területét a H&E tárgylemezen kizárva a környező nem tumoros szövetet.
- Egy patológusnak vagy egy képzett laboratóriumi technikusnak meg kell becsülnie a tumor cellularitását és felületét a H&E festett tárgylemezen bekarikázott területen belül.
 - A tumor cellularitási százaléka a H&E festett tárgylemezen kötelezően $\geq 10\%$.
 - A tumor bekarikázott felülete a H&E festett tárgylemezen kötelezően $\geq 4 \text{ mm}^2$

*Vegye figyelembe, hogy a tumor cellularitási százaléka a bekarikázott tumorterületen belüli életképes tumorcellák százalékos értékére utal.
- A teszt bemeneteként javasolt 100 mm²-nél nagyobb teljes tumorfelületet megadni. Az alábbi táblázat a H&E festett tárgylemezen mért tumorterület alapján javasolt tárgylemezszámot mutatja meg.
- Ha a szövet felülvizsgálati eljárása azt állapítja meg, hogy a tumorblokk tumorterülete cellularitása nem megfelelő, ugyanazon tumor másik blokkját kell megvizsgálni. Ha nincs megfelelő tumorszövetet tartalmazó FFPE-blokk, a Prosigna tesztje nem futtatható. Vegye figyelembe, hogy a 20 mm²-nél kisebb felületű tumorok esetében nagyobb a valószínűsége, hogy az RNS bemeneti követelményei nem teljesülnek.

5. táblázat: Tárgylemez javasolt követelményei a tumor felülete alapján

Tumor mért felülete a H&E festett tárgylemezen (mm ²)	Festetlen tárgylemezek száma
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Minta gyűjtése és tárolása

- Az alábbiakat a laboratórium szokásos működési eljárásai szerint végezheti el: szövet gyűjtése és fixálás formalinban, FFPE tumorblokk kezelése és tárolása, illetve a tárgylemezre rögzített FFPE szövet szállítása.
- A tárgylemezre rögzített FFPE szövetrészeket a laboratórium normál működési eljárásai szerint kell tárolni. Ha a tárgylemezeket hosszabb ideig (> 30 nap) tárolja, azokat száraz környezetben kell elhelyezni, és 9 hónapon belül fel kell dolgozni a teszteredmények minőségének biztosításához.

11.3 A tárgylemez előkészítése

- Mikrotóm használatával vágjon 4–5 µm vastag részt H&E festéshez.
- Mikrotóm használatával vágjon 10 µm vastag részt a Prosigna teszthez történő használatához.
- A részeket lebegtesse 40 °C-os vízfürdőben.
- Rögzítse a részeket pozitív töltésű üveg mikroszkóptárgylemezre.
- A tárgylemezeket hagyja megszáradni levegőn.
- A tárgylemezeket égesse ki egy éjszaka alatt, 45 °C-on.

11.4 A tárgylemez feldolgozása

- Készítsen elő 3%-os glicerín munkaoldatot: 1,5 ml glicerint keverjen össze 48,5 ml molekuláris minőségű, nukleázmentes vízzel; a mennyiség szükség esetén többszörözhető. Az oldatot öntse Coplin-féle edénybe a tárgylemezek feldolgozásához.
- Öntsön körülbelül 200-250 ml D-limonén tisztítószert két festőedénybe, biztosítva, hogy a tárgylemeztartón lévő tárgylemezek teljesen elmerüljenek.
- Öntsön körülbelül 200-250 ml abszolút etanolt (EtOH) a harmadik festőedénybe.
- A festetlen tárgylemezre rögzített szövetrész(ek)e)t helyezze a tárgylemeztartóba.
- Helyezze a tárgylemeztartót az első D-limonén festőedénybe, és óvatosan mozgassa előre-hátra a tárgylemeztartót 10-15 másodpercig. Hagyja a tartót az első D-limonén festőedényben összesen 2 percig.
- Helyezze át a tárgylemeztartót az első D-limonén festőedényből a második D-limonén edénybe. Óvatosan mozgassa előre-hátra a tárgylemeztartót 10-15 másodpercig. Hagyja a tárgylemeztartót a második D-limonén festőedényben összesen 2 percig. Ellenőrizze, hogy minden paraffint eltávolított-e; ha nem, hagyja a tartót a második D-limonén festőedényben még körülbelül 1 percig.
- Helyezze át a tárgylemeztartót a második D-limonén festőedényből az EtOH fürdőbe. Óvatosan mozgassa előre-hátra a tárgylemeztartót 10-15 másodpercig, majd 2 perc után vegye ki.
- Hagyja levegőn száradni a tárgylemezeket 5-10 percig vagy amíg teljesen megszáradnak, és a szövet fehérnek tűnik (ez a szövet méretétől függően hosszabb ideig tarthat).
- Jelölje ki a tumor körvonalát a festetlen tárgylemez(ek) hátulján a megfelelő H&E festett tárgylemezhez igazításával és a körberajzolt terület átvitelével.
- Ha egyszerre egy tárgylemezzel dolgozik, rehidratálja a szövetet a jelöléses festetlen tárgylemezen annak 3%-os glicerínoldatba merítésével.
- Távolítsa el a felesleges glicerint a tárgylemezről laboratóriumikendővel.
- Ha a felhasználó több tárgylemezt dolgoz fel, hagyhatja azokat szárító tartón kiszáradni, miközben a többi tárgylemezt hidratálja.
- Borotvapengével vagy szikével kaparja le a megjelölt tumorterület körüli nem tumoros szövetet, és tegye félre.
- A tárgylemez egyik végét tartva és a másik végét 45 fokos szögben szilárd felületre helyezve gyűjtse a makrodisszekált tumorszövetet a borotvapenge élére. A szövetnek a begyűjtéskor egyszerűen a borotvapengére kell „gördülnie”.
- Ismételje meg az előző lépést egy adott minta minden tárgylemeze esetében.

Megjegyzés: Egyetlen FFPE minta több festetlen tárgylemezét ugyanarra a borotvapengére gyűjtheti.

- Az azonos mintából származó szövetrészeket óvatosan csúsztaga egy címkével ellátott, 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe.
- Ha használta, tisztítsa meg a disszekáló tűt vagy a csipeszt néhány másodperces D-limonénbe merítéssel, majd szárítsa meg a szövetminták között.

11.5 Az RNS izolálása

A Veracyte a Roche FFPET RNS-izolációs készlet vagy a Veracyte FFPE RNS-extrakciós készlet használatát javasolja, amelyeknek Prosigna teszthez való használata jóváhagyott.

Más RNS-izolációs készleteket is használhat minták előkészítéséhez a Prosigna számára, ha a tárgylemezhez rögzített FFPE emlőtumor-szövetrészekből kinyert RNS megfelel az alábbi specifikációnak:

6. táblázat: RNS-izolációs készlet specifikációja

Jellemző	Teszt vagy mérés	Specifikáció
RNS-koncentráció	Optikai sűrűség 260 nm esetén	≥ 12,5 ng/μl
RNS teljes térfogata (μl)	Teljes eluált mennyiség	≥ 12 μl
RNS tisztasága	A 260 nm-nél és a 280 nm-nél mért optikai sűrűség aránya (OD 260/280 nm)	1,7–2,3
DNS szennyeződése	Eluált RNS-minta genomiális DNS-tartalma	≤ 1 ng/μl
RNS integritása	Az izolált RNS-fragmentumok méret szerinti megoszlása	Az izolált RNS-fragmentumok legalább 90%-a hosszának nagyobbak kell lennie 100 nukleotidnál.

Vigyzat: Ha a Prosigna teszttel együttesen egy alternatív izolációs eljárást is alkalmaz, a rutinszerű használatot megelőzően ezt az adott munkafolyamatot a laboratóriumnak teljes egészében jóvá kell hagynia.

RNS izolálási eljárása:

- Ha a Roche FFPET RNS-izolációs készletet használja, kövesse az RNS izolálására vonatkozó, alábbiakban részletezett specifikus utasításokat.
- Ha a Veracyte FFPE RNS-extrakciós készletet használja, kövesse a Veracyte cégtől kapott használati útmutatót, majd lépjen a 11.6 szakaszhoz.
- Ha alternatív extrakciós módszert alkalmaz, kövesse a jóváhagyott protokollt vagy a gyártótól kapott protokollt, majd lépjen a 11.6 szakaszhoz.

A Roche és a Veracyte által gyártott RNS-extrakciós készlet minden egyes tétele minőségében alkalmas arra, hogy a diagnosztikai géneexpressziós tesztek előre meghatározott specifikációinak megfelelő RNS-mintákat állítsanak elő. A választott RNS-extrakciós készlet megfelelő tárolására, a biztonságra és a kezelésére vonatkozó utasításokat az adott készlet módszerleírásában/használati utasításában talál.

A munkaidőkezelés előkészítése a Roche FFPET RNS-izolációs készlet használatával

- A szövet feloldása és az RNS izolálása előtt készítse elő a munkaidőkezeléseket:

A munkaidőkezelés előkészítése	
Reagens	Eljárás
Mosópuffer I (WB1)*	Adjon hozzá 15 ml 100%-os etanol, az előkészített WB1-t +15 és +25 °C közötti hőmérsékleten tárolja.
Mosópuffer II (WB2)*	Adjon hozzá 80 ml 100%-os etanol, az előkészített WB2-t +15 és +25 °C közötti hőmérsékleten tárolja.
Proteináz K (PK)	Oldja fel a liofilizált Proteináz K-t 4,5 ml reagens-előkészítő pufferben (RPB). Készítsen elő 600 μl alikvotot, címkézze fel, és tárolja -15 és -25 °C közötti hőmérsékleten.
DNase I (DNase I)*	Oldja fel a liofilizált DNase-t 740 μl reagens-előkészítő pufferben (RPB). Készítsen elő 50 μl alikvotot, címkézze fel, és tárolja -15 és -25 °C közötti hőmérsékleten.

Megjegyzés: A csillaggal (*) jelölt alkotórészek a szövet feloldásáig nem kötelezőek.

A szövet feloldása a Roche FFPET RNS-izolációs készlet használatával

- Olvasszon fel megfelelő számú Proteináz K (PK) alikvotot. A felolvasztás után az alikvotot jégen tárolja, amíg készen áll a használatra.
- Megjegyzés:** Egy 600 μl-es PK alikvot 4 szövet feloldásához elegendő Proteináz K-t tartalmaz.
- Adjon hozzá 100 μl szövet lízis puffert (TLB), 16 μl 10%-os SDS-t és 120 μl Proteináz K munkaidőkezelést tartalmazó mintacsövekhez.
 - A szövetet tartalmazó mintacsöveket mozgassa körbe néhány másodpercig, majd röviden centrifugálja.
 - 55 °C-on inkubálja éjszaka (12–23 órán keresztül).

RNS-izoláció a Roche FFPET RNS-izolációs készlet használatával

- Vizuálisan vizsgálja meg a mintacsöveket annak meghatározásához, hogy a szövet teljesen feloldott-e. Ha a feloldás befejeződött, tisztának tűnik, és az oldatban kevés vagy semennyi szövet nem marad.
 - Ha a feloldás befejeződött, folytassa a következő lépéssel.
 - Ha a feloldás nem teljesen ment végbe, adjon hozzá még 20 μl Proteináz K-t, és inkubálja még egy óráig.
- Röviden (< 30 másodpercig, mini centrifugában) centrifugálja az összes mintát.
- Inkubálja a mintákat 80 °C-on 15 percig.
- Készítsen elő vagy olvasszon fel megfelelő számú DNase alikvotot. A felolvasztás után az alikvotot jégen tárolja, amíg készen áll a használatra.

Megjegyzés: Egy 50 μl-es DNase alikvot 4 RNS-izolációhoz elegendő DNase-t tartalmaz.
- Hígítsa a DNase-t DNase inkubációs pufferben (DIB). Az N (az RNS-izoláció számának) szükséges értéke: (N+1) × 90 μl DNase inkubációs puffer + (N+1) × 10 μl DNase. A hígított DNase oldatot tárolja jégen, amíg használatra kész.
- Minden mintához adjon hozzá 325 μl paraffinkötő puffert (PBB) és 325 μl abszolút etanol, és pipettálással keverje el.
- Röviden (< 30 másodpercig, mini centrifugában) centrifugálja.
- Helyezzen egy nagy tisztaságú szűrőcsövet egy nagy tisztaságú gyűjtőcsőre.
- A mintát pipettálja a szűrőcső felső tartályába úgy, hogy ne legyen maradék szövet.
- Centrifugálja 30 másodpercig 6000 × g sebességgel.
- Helyezzen egy nagy tisztaságú szűrőcsövet egy új nagy tisztaságú gyűjtőcsőre (az átfolyáshoz használt korábbi gyűjtőcsövet dobja el).
- Centrifugálja 2 percig 16 000 × g sebességgel a szűrő gyapjú teljes kiszáritásához.
- Helyezzen egy nagy tisztaságú szűrőcsövet egy új nagy tisztaságú gyűjtőcsőre (az átfolyáshoz használt korábbi gyűjtőcsövet dobja el).
- Adjon hozzá 100 μl hígított DNase oldatot a nagy tisztaságú szűrőcső szűrőgyapjún keresztül, centrifugálja 20–30 másodpercig +25 °C közötti hőmérsékleten.
- Adjon hozzá 500 μl mosópuffer I munkaidőkezelést (WB1) nagy tisztaságú szűrőgyapjún keresztül, centrifugálja 20–30 másodpercig 6000 × g sebességgel, és szüntesse meg az átfolyást.
- Adjon hozzá 500 μl mosópuffer II munkaidőkezelést (WB2) nagy tisztaságú szűrőgyapjún keresztül, centrifugálja 20–30 másodpercig 6000 × g sebességgel, és szüntesse meg az átfolyást.
- Adjon hozzá 500 μl mosópuffer II munkaidőkezelést (WB2) nagy tisztaságú szűrőgyapjún keresztül, centrifugálja 20–30 másodpercig 6000 × g sebességgel, és szüntesse meg az átfolyást.
- Centrifugálja 2 percig 16 000 × g sebességgel a szűrőgyapjú teljes kiszáritásáig.
- Helyezze a nagy tisztaságú szűrőcsövet a címkézett RNase-mentes 1,5 vagy 1,7 ml-es mikrocentrifuga csőbe.
- Adjon hozzá 30 μl eluáló puffert (EB) a nagy tisztaságú szűrőgyapjú közepébe.
- Inkubálja 1 percig +15 és +25 °C közötti hőmérsékleten.
- Centrifugálja 1 percig 6000 × g sebességgel az RNS eluálásához az oszlopból. Vegye ki és dobja el a nagy tisztaságú szűrőcsövet.
- Centrifugálja az eluált RNS-t a mikrocentrifuga csőben 2 percig, maximális sebességen.
- Töltsse át a felülúszó folyadékot 0,5 ml-es csavaros kupakos csőbe az üvegszálak érintése nélkül, amelyeket a berendezés a szűrőgyapjúból kimoshatott az eredeti cső aljánál.

11.6 Az RNS koncentrációjának és minőségének mérése

- Mérje meg az izolált RNS koncentrációját az adott munkanapon belül (tárolja +2 és +8 °C között), vagy a használatig fagyassza le -70 °C-os vagy alacsonyabb hőmérsékleten.
- Mérje meg 2 μl-nyi izolált RNS optikai sűrűségét (OD) 260 és 280 nm-nél a 10.3 A berendezés specifikációja fejezetben definiált specifikációnak megfelelő spektrofotométerrel. Ha maradt üvegszál, 2 μl-es mennyiséget ne pipettálja a forráscső aljánál, mert az megzavarhatja az optikai sűrűség leolvasását.
- Az RNS mérésével kapcsolatban kövesse a spektrofotométer gyártójának utasításait.
- Ha egy minta nem felel meg az RNS minimális tisztasági vagy koncentrációértékeinek (6. táblázat), centrifugálja a mintacsövet 1 percig maximális sebességen (> 10 000 × g), helyezze a csövet jégre, majd ismételje meg a mérést. Ha a minta továbbra sem felel meg a tisztasági vagy a koncentrációértékeknek, az RNS-minta nem elemezhető a Prosigna teszttel. Nem megfelelő minőségű vagy mennyiségű RNS-t ne használjon a Prosigna teszthez.
- Az RNS kivonatosítását megismételheti, ha koncentráció vagy a tisztaság minimális értékét nem érte el (6. táblázat). A felhasználó választhat, hogy további tárgylemezeket izolál ugyanazon FFPE-blokkból, vagy ugyanazon beteg egy másik blokkját használja.

6. Ha az RNS koncentrációja nagyobb, mint 250 ng/μl, molekuláris minőségű, RNase- és DNase-mentes vízzel kell hígítani 200 ng/μl koncentrációig, mielőtt a további hibridizálási tesztet végrehajtja. Használja a hígítatlan minta rögzített OD 260/280 arányú optikai sűrűségét annak meghatározásához, hogy a hígított minta megfelel-e az 1,7-es minimális RNS-tisztaságnak.
7. Ha a Prosigna tesztet nem tudja ugyanazon a munkanapon elvégezni, fagyassza le az RNS-t -70 °C-os vagy alacsonyabb hőmérsékleten.

11.7 A tesztelési eljárás

Ez a tesztelési eljárás a Prosigna teszt nCounter elemző rendszerrel történő elvégzésének lépéseit írja le. A lépések az alábbi kategóriákba sorolhatók két egymást követő napon:

Első nap

- Futtatási szett azonosítójának beállítása (RSID) a webes alkalmazásban
- Az RNS hibridizálásának beállítása a Prosigna CodeSettel (30 perc beállítás, 15–21 órányi hibridizálás)

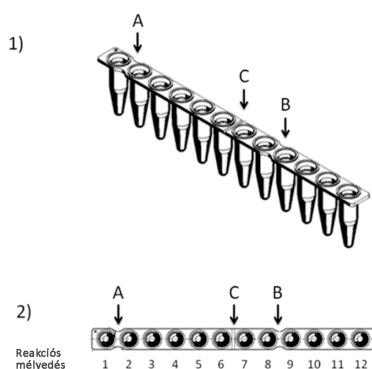
Második nap

- Az előkészítő állomás beállítása és futtatása (20 perc beállítás, 2–3 óra futtatásonként a mintafuttatások számától függően)
- Kazetta beállítása és szkennelése a digitális elemzőn (5 perc beállítás, 2,5–4,5 óra minden kazetta esetében a mintafuttatások számától függően)
- A jelentés lekérése (30 perc)

Beteg mintájának kiválasztása és tétel beállítása

1. Határozza meg a teszt futtatás részét képező betegmintákat. Minden tétel legfeljebb 10 mintát tartalmazhat.
 - a. A berendezés a tételben található minden mintát hozzárendel a hibridizáláshoz használt 12 mélyedéses csősor egy egyedi pozíciójához, amely a futtatási szett azonosítójának részeként van regisztrálva a berendezésen (a futtatási szett azonosítója a webes alkalmazásban állítható be). Vegye figyelembe, hogy az 1-es és a 2-es pozíció a referenciamintának, a 3–12 pozíció pedig tumoros RNS-mintáknak van fenntartva.
 - b. Az alábbi illusztráción a csősor oldalnézete (1) és felülnézete (2) látható. A csősorok aszimmetrikusan vannak megjelölve az 1-es és a 2-es reakciós mélyedés között (A), illetve a 8-as és a 9-es mélyedés között (B), így elősegítve a minták sorrendjének betartását a feldolgozás során. A csősorok a 6-os és a 7-es reakciós mélyedések között is be vannak vágva (C) a csősor elvágásának megkönnyítése érdekében, ha az a szabványos centrifuga-adapterek miatt szükséges.

6. ábra: A jelöléses csősor illusztrációja



2. Számítsa ki a hibridizálási reakcióhoz hozzáadandó RNS és víz (ha szükséges) mennyiségét a tétel minden mintája esetében.
 - a. A teszt esetében az RNS javasolt bemeneti mennyisége 250 ng. A hibridizáláshoz az RNS elfogadható bemeneti tartománya 125–500 ng.
 - b. Számítsa ki a hibridizálási reakcióhoz hozzáadandó RNS-minta mennyiségét (mikroliterben). Ehhez ossza el a minta kívánt bemeneti értékét (például 250 ng) a mért koncentrációval.

- c. Ha a minta kiszámított koncentrációja 12,5 ng/μl és 25 ng/μl közötti, adja hozzá a maximális mennyiséget (10 μl).
- d. A 10 μl-nél kevesebbet igénylő minták esetében 10 μl teljes mintamennyiség létrehozásához szükséges vízmennyiséget számítsa ki.

Példa: Ha egy minta mért RNS-koncentrációja 85 ng/μl, 2,9 μl minta szükséges 250 ng teljes tömegesítéshez, és 7,1 μl víz szükséges a mennyiség 10 μl-re csökkentéséhez, mielőtt hozzáadja a fennmaradó reagenseket. Egyenlettel: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Minta regisztrálása és feldolgozása

A felhasználó egyedi futtatási szett-azonosítót hoz létre minden mintatételhez a mintaazonosítók hozzárendelésével a csősor helyéhez (3–12 pozíció) az nCounter elemző rendszer szolgáltatásainak webes alkalmazásában. A felhasználó a használati útmutatóban talál az nCounter elemző rendszer szolgáltatásai webes alkalmazásának használatával kapcsolatos információt.

1. Ha az RNS a használat előtt fagyasztott volt, a folytatás előtt hajtja végre az alábbi lépéseket:
 - a. Teljesen olvassa fel az RNS-mintát, és tárolja jégén.
 - b. Centrifugálja a felolvasztott mintacsövet 1 percig maximális sebességgel ($> 10,000 \times g$), majd helyezze vissza a jégre.
 2. Válassza a megfelelő méretű Prosigna tesztkészletet a tesztelni kívánt betegminták száma (1, 2, 3, 4 vagy 10) alapján. Vegyen ki a -80 °C-os fagyasztóból egy csőnyt a CodeSet készlet következő reagenseiből a felolvasztáshoz. Ha a következő lépéseket nem hajtja végre azonnal, a reagenseket tárolja jégén.
 - a. Prosigna riporter CodeSet (zöld matrica a kupakon)
 - b. Prosigna elfogó ProbeSet (szürke matrica a kupakon)
 - c. Prosigna referenciaminta (nincs matrica a kupakon)
 3. A CodeSet dobozából vegye ki a CodeSet tétel vonalkódmatricáját és a teszt konfigurációs kódját.
 4. Webböngészőben jelentkezzen be az IVD nCounter elemző rendszer webes alkalmazásába, és válassza a Prosigna tesztípust a digitális regisztrációs űrlapok beállításának megkezdéséhez.
 5. A főoldalon válassza a „Create New Run Set” (Új futtatási szett létrehozása) elemet.
 6. A Prosigna futtatásának első kötelezően kitöltendő mezője a Run Set ID (Futtatási szett azonosítója). A Run Set ID (Futtatási szett azonosítója) mezőben adja meg mintaköteg egyedi azonosítóját.
 7. A webes alkalmazásban szkennelje be vagy manuálisan írja be a teszt konfigurációs kódját. A szkennelt vagy a beírt érték elvethető.
 8. A webes alkalmazásban szkennelje be vagy manuálisan írja be a CodeSet készletszámát.
 9. Ezután a mintaazonosító megfelelő mezőjében adja meg a minta egyedi azonosítóját, amely a csősor harmadik pozíciójában/ mélyedésében lesz található.
 - a. Adja meg a beteg RNS-mintaazonosítóit vonalkóddolvasóval vagy a mintaazonosítók billentyűzettel történő beírásával.
 - b. A mintaazonosítók megadása után lépjen át a mintához tartozó kötelező legördülő mezők (tumor bruttó mérete és csomóállapot) kitöltéséhez, mielőtt a következő mintát beviszi.
 - i. A beteg patológiai kiértékelése során megállapított pozitív csomószám alapján válassza ki a teszt megfelelő csomókatagóriáját (nulla, 1–3, ≥ 4).
 - ii. A mért bruttó tumorméret vagy a beteg patológiai kiértékelése során megállapított stádium alapján válassza ki a teszthez a bruttó tumorméretnek megfelelő kategóriát ($\leq 2 \text{ cm}$ vagy $> 2 \text{ cm}$).
 - c. Minden mintához megjegyzést írhat be a Memo (Emlékeztető) mezőbe.
- Megjegyzés:** Ha a csősor bármely mélyedése/pozíciója nem szükséges, hagyja üresen a fennmaradó mezőket. Ha további mezők szükségesek a további mintákhoz, használjon másik tesztkonfigurációt, amely több mintát képes befogadni.
10. A mintabevitel befejezése után adja meg, hogy mely felhasználók kapják meg az alábbiakat:
 - a. Az előkészítő állomás és a digitális elemző futtatásaival kapcsolatos állapotfrissítések
 - b. Értesítés a végső jelentés rendelkezésre állásáról
 11. Mentse a befejezett futtatási szettet.
 - a. A futtatási szett munkalapját nyomtathatja, és a minta nyomon követéséhez és ellenőrzéséhez használhatja.

A hibridizálási reakció eljárása

Megjegyzés: Az alábbi lépések tíz (10) betegmintát és két (2) referenciáminót feltételeznek.

Megjegyzés: A riporter CodeSetet ne centrifugálja $3,000 \times g$ -nél nagyobb sebességgel és 10 másodpercnél tovább, illetve a centrifugáláshoz ne használja az „impulzus” beállítást. Ha ezt teszi, a centrifuga elérheti a maximális sebességet, és a CodeSetet kicentrifugálhatja az oldalból.

1. Programozza a hőblokkot 30 μ l-es mennyiséggel, a számított blokk- és fedélhőmérséklettel és a „végtelen” időbeállítással (vagy azzal egyenértékű megtartási időbeállítással). A hőblokk hőmérsékletét állítsa 65 °C-ra, a fűtött fedélét pedig 70 °C-ra.

Megjegyzés: Kritikus fontosságú, hogy az alábbi lépések során betartsa a minták csősorhoz adásának sorrendjét, így biztosítsa, hogy az megegyezzen a futtatási szett azonosítóinak sorrendjével.

2. Címkezze fel a kapott jelöléses, 12 mélyedéses csősort az 1-6 pozíció és a 7-12 pozíció megkülönböztetéséhez (lásd a csősor illusztrációját).

3. Ha szükséges, vágja félbe a csősort, hogy az beférjen egy mini centrifugába a csősoradapterrel.

4. Pipettáljon 10 μ l referenciáminót a jelöléses csősor 1-es és a 2-es pozíciójába.

5. Pipettáljon az egyes mintákhoz szükséges, kiszámított mennyiségű vizet a jelöléses csősor megfelelő pozícióiba.

6. Pipettáljon az egyes mintákhoz szükséges kiszámított mennyiségű RNS-t a jelöléses csősor megfelelő pozíciójába minden mintához új pipettát használva.

7. A betegminta csősorhoz adása után javasolt mintacsövet mintacsőtartóra helyezni, megtartva a minták csősorhoz adásának sorrendjét. Így ellenőrizhető az összes minta csősorhoz adása után, hogy a mintákat a megfelelő sorrendben adta-e hozzá.

8. Miután az összes mintát hozzáadta a csősorhoz, ellenőrizze, hogy betartotta-e a minták sorrendjét a csősorban (a minták sorrendjének ellenőrzéséhez a futtatási szett munkalapját használhatja).

a Ha szükséges, a webes alkalmazásban szerkessze úgy a futtatási szett azonosítóját, hogy az megfeleljen a mintasorrendnek a végső elrendezésen (a meglévő futtatásiszett-azonosító szerkesztésével kapcsolatos utasításokat az nCounter elemző rendszer használati útmutatójában talál).

9. A mintasorrend ellenőrzése után helyezze ismét jégre az egyes RNS-mintacsöveket.

10. Készítsen a hibridizációs pufferből 130 μ l-t és a riporter CodeSetből 65 μ l-t tartalmazó fő keveréket.

Megjegyzés: Ha a riporter CodeSetet jégen tárolta, hagyja azt 1 percig szobahőmérsékletre melegedni, mielőtt a hibridizáció pufferhez adja.

11. Pipettálással keverje össze, majd centrifugálja a fő keveréket.

Megjegyzés: Az elfogó ProbeSetet ne adja a fő keverékhez, ÉS ne tárolja a kész fő keveréket jégen.

12. Pipettáljon 15 μ l fő keveréket a 12 mélyedés mindegyikébe. Minden mélyedéshez használjon új pipettát.

Megjegyzés: A következő lépés végrehajtása után a csősort 15 percen belül a hőblokkba kell helyezni 65 °C-os hőmérsékleten.

13. Adjon 5 μ l elfogó ProbeSetet minden mélyedésbe, minden mélyedés esetében új pipettát használva.

14. Zárja le a csősor mélyedéseit, és keverje össze a reagenseket a csősor többszöri megfordításával, majd pöckölje meg az ujjával a teljes keveredés biztosításához.

15. Pikofugában vagy mini centrifugában röviden centrifugálja a mintákat a csősorban ($3000 \times g$ -nél kisebb sebességgel).

Megjegyzés: Használjon 12 mélyedéses csősor befogadására alkalmas pikofugát, vagy ha szükséges, levágott csősorok befogadására alkalmas mini centrifugát.

16. Helyezze a csősor(oka)t 65 °C-os hőblokkba fűtött fedéllel. Inkubálja a hibridizációs tesztek 65 °C-on, 15-21 órán keresztül. A hibridizációt 65 °C-on kell tartani, amíg készen áll az előkészítő állomáson történő feldolgozásra.

Megjegyzés: A nem használt CodeSetet dobja ki.

Minták feldolgozása az nCounter előkészítő állomáson

1. Keresse meg a digitális elemzőhöz rendelt előkészítő állomást.

2. Vegye ki az nCounter kazettát a -20 °C-os tárolóból, és a fóliatasakban hagyja 10-15 percig szobahőmérsékletre melegedni.

Megjegyzés: Ügyeljen arra, hogy azonos készletből származó alkotórészeket használjon együtt.

3. Amikor a kazetta elérte a szobahőmérsékletet, vegye ki a fóliatasakból, mielőtt behelyezi a kazettát az előkészítő állomás munkatálcájára.

4. Vegye ki az nCounter előkészítő tálcákat a 4 °C-os tárolóból, és hagyja 10-15 percig szobahőmérsékletre melegedni.

Megjegyzés: Csak egy előkészítő tálcát szükséges az 1-, 2-, 3- vagy 4-tesztos Prosigna készlettel végzett futtatásokhoz.

5. Centrifugálja az előkészítő tálcákat $2000 \times g$ fordulatszámon 2 percig, hogy a folyadék összegyűljön a bemélyedések alján, és csak ezt követően tölts be az előkészítő tálcákat az előkészítő állomás munkatálcájára.

6. Amíg a kazetták és az előkészítő tálcák elérik a szobahőmérsékletet, készítse elő az előkészítő állomást az nCounter előkészítő csomag fogyóeszközeivel.

7. Az nCounter előkészítő állomás érintőképernyős felületén koppintson a tesztjének megfelelő „Diagnostics” (Diagnosztika) gombra.

8. Az érintőképernyős felületen, a Main Menu (Főmenü) képernyője alatt koppintson a „Process Samples” (Minták feldolgozása) gombra.

9. Tallózzon a rendelkezésre álló futtatásiszett-azonosítók (RSID) között (a képernyőn illusztrálva) a jelenleg feldolgozás alatt álló minták RSID-jének megerősítéséhez.

10. Válassza ki az RSID-t a képernyő megérintésével, majd koppintson az érintőképernyős felület „Next” (Következő) gombjára.

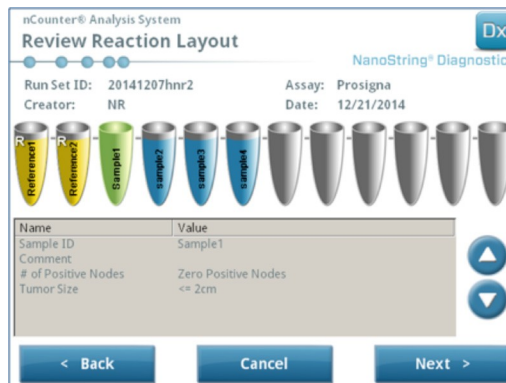
11. Az érintőképernyős felületen ellenőrizze, hogy a megfelelő RSID-t választotta-e ki: a képernyőn nézze meg az egyes csöveket, és ellenőrizze ismét a minta adatait.

a Itt használhatja a futtatási szett munkalapját a minta nyomon követéséhez és ellenőrzéséhez.

b Ha helytelen RSID-t választott, érintse meg a „Back” (Vissza) gombot, és válasszon helyes értéket.

c Ha az RSID helyes volt, de mintabeviteli hiba lépett fel, érintse meg a „Back” (Vissza) gombot, menjen egy számítógépes munkaállomáshoz, és szerkessze az RSID-t a webes alkalmazásban.

7. ábra: Futtatás feldolgozása előkészítő állomáson



12. A következő néhány képernyőn a rendszer a reagensek vonalkódjának szkennelését kéri az üres mezőbe, illetve a szükséges fogyóeszközök munkatálcára helyezését megerősítésére utasít. Az egyes feladatok végrehajtása után koppintson az érintőképernyős felület „Next” (Következő) gombjára a következő utasításra lépéshez.

Megjegyzés: Csak egy előkészítő tálcát és egy üres fűtőelem-csősor szükséges az 1-, 2-, 3- vagy 4-tesztos Prosigna készlettel végzett futtatásokhoz. 1, 2, 3 vagy 4 tesztkészletes futtatások esetében tölts be az előkészítő tálcát és az üres fűtőelem-csősor a megfelelő elülső pozícióba (a felhasználóhoz legközelebb) az előkészítő állomás munkatálcáján.

13. Vegye ki a mintákat a hőblokkból.

Megjegyzés: Az előkészítő állomás futását a minták hőblokkból történő eltávolítását követő 15 percen belül kezdje meg.

14. A csősor(oka)t helyezze pikofugába vagy mini centrifugába, és centrifugálja röviden ($3000 \times g$ -nél kisebb sebességgel).

15. Óvatosan vegye ki a sapkát a csősor(ok)ból.

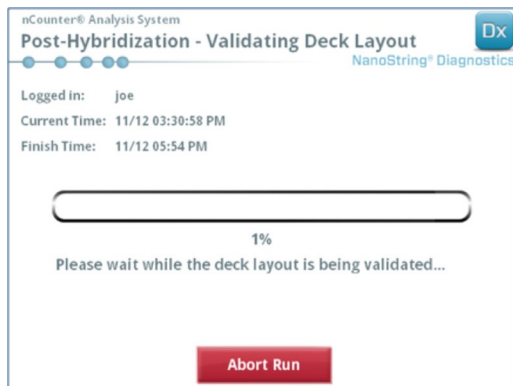
16. A csősoron található bevágásoknak és az előkészítő állomáson található vezetőknek biztosítaniuk kell a minták helyes sorrendjét és irányát.

17. Helyezze a mélyedéses csősor(oka)t balról jobbra 1-12 sorrendben az nCounter előkészítő állomás munkatálcájára. Ha 1, 2, 3 vagy 4 tesztos készlettel hajt végre futást, csak a csősor első felét (1-6. mélyedés) kell behelyezni a munkatálcá mintacsőtartójának bal oldalába (ha lehetséges). Fontos, hogy csak az 1-6. mélyedést használja; a csősor másik fele (7-12. mélyedés) a cső bevágásos kialakítása miatt nem fog beférni a tartó bal oldalába.

18. Győződjön meg arról, hogy a csősorok szilárdan be vannak helyezve az előkészítő állomásba, majd zárja le a fém fedelet.

19. Ha a fedél nem zárható megfelelően, a munkatálca elrendezésének ellenőrzésekor a berendezés a lezárására utasítja.
20. Az érintőképernyős felületen koppintson a „Next” (Következő) elemre.
21. Csukja be a berendezés ajtaját, amikor utasítást kap, majd koppintson a „Next” (Következő) elemre a munkatálca elrendezése ellenőrzésének megkezdéséhez.
22. Ha hiba történik, kövesse az ahhoz tartozó utasításokat a munkatálca elrendezése ellenőrzésének folytatásához.

8. ábra: Munkatálca elrendezésének ellenőrzése a hibridizálás után az előkészítő állomáson



23. A munkatálca elrendezésének ellenőrzése után válassza a „Start Processing” (Feldolgozás indítása) elemet az érintőképernyős felületen.
Megjegyzés: Ha probléma merül fel az előkészítő állomás indításakor, a hibridizált mintákat helyezze vissza a hőblokkba, de a 21 órássá maximális időt ne haladja meg.
24. A futtatás után kövesse az előkészítő állomáson megjelenő utasításokat.
25. Amikor az előkészítő állomáson befejeződik a futtatás, óvatosan vegye ki a kazettát az előkészítő állomásból, és a kazetta bemélyedéseit zárja le a kapott öntapadó fedéllel.
Megjegyzés: A kazettát ne hagyja éjszakára lezáratlanul az előkészítő állomásban.
26. Ha a mintákat az adott napon nem szkenneli be, a kazettát tárolja 4 °C-on áttetsző dobozban legfeljebb 1 hétig.

Kazetta szkennelése az nCounter digitális elemzőben

1. Keresse meg a mintákat feldolgozó előkészítő állomáshoz tartozó digitális elemzőt. Töltse be a kazettát az nCounter digitális elemzőbe a szkenneléshez.
 - a. Nyissa ki a digitális elemző ajtaját.
 - b. Helyezze a hozzáadni kívánt kazettát egy üres nyílásba.
 - c. Zárja be az ajtót, és kövesse az érintőképernyőn megjelenő utasításokat.
2. A digitális elemző érintőképernyőjén különböző grafikák találhatók, amelyek alapján egyszerűen azonosítható a pozíciós állapot:
 - a. Üres hely: A nyílás üres és készen áll új kazetta betöltésére.
 - b. Teljesen kék kazetta: Szkennelés befejezve.

NE TÁVOLÍTSA EL AZ ALÁBBI KAZETTÁKAT:

 - a. Fehér kazetta: Ebben a nyílásban regisztrált, de még nem szkennelt kazetta található.
 - b. Részlegesen kék kazetta: Ebben a nyílásban szkennelés alatt áll kazetta található.
3. A kazetták, amelyek szkennelése befejeződött, kivethetők a digitális elemzőből.
4. Ha ez a digitális elemzőbe töltött első kazetta, érintse meg a „Diagnostics” (Diagnosztika) gombot, majd válassza a „Main Menu” (Főmenü) elemet a digitális elemzőbe történő bejelentkezéshez. Ha a digitális elemző már kazettákat szkennel, folytassa a lenti 9. lépéssel.
5. Óvatosan helyezze a kazettát a digitális elemző egy üres nyílásába (lásd a pozíciós állapotra vonatkozó fenti útmutatót). A nyílás és a kazetta meg van jelölve a helyes irány betartásához. A vonalkód felfelé néz.
6. Eressze le a nyílás fedelét, és annak nyílásán keresztül nyomja meg a kazettát a kazetta megfelelő behelyezéséhez.
7. Érintse meg a „Start Counting” (Számolás indítása) gombot, és várjon, amíg a szkennel megkezdődik a szkennelés. Halk, ritmikus kattogó hangokat fog hallani, amikor a digitális elemző megkezd a kazetta szkennelését.
8. Győződjön meg arról, hogy a kazetta pozíciójában kék sáv jelenik meg a képernyőn (a szkennelés megkezdésétől számított ötpercen belül), jelezve, hogy a szkennelés megkezdődött.

9. Ha olyan digitális elemzőhöz szeretne kazettát adni, amely már kazettákat szkennel, érintse meg a „Pause” (Szüneteltetés) gombot a „Counting Cartridges” (Kazetta számlálása) képernyőn, és várjon, amíg a digitális elemző szünetelteti az aktuális szkennelést.
10. Nyissa ki a digitális elemző ajtaját.
11. Helyezze a hozzáadni kívánt kazettát egy üres nyílásba (lásd a pozíciós állapotra vonatkozó fenti útmutatót).
12. Zárja be az ajtót, és érintse meg a „Resume” (Folytatás) gombot.
13. A szkennelés befejezése után a szoftver a jelentést elküldi az előzőleg megadott felhasználói e-mail-címekre.
14. Amikor e-mail-értesítést kap, vegye ki a kész kazettát, és ártalmatlanítsa az intézmény útmutatásai szerint.
Megjegyzés: A berendezés a sikeresen végrehajtott futtatások és az adatokkal kapcsolatos minőség-ellenőrzési (QC) hibákat eredményező futtatások esetében is készít jelentést. A berendezés nem készít jelentést, ha nem az adatokkal kapcsolatos minőség-ellenőrzési hiba történik. Ha ilyen hiba történik, forduljon segítségért a Veracyte ügyfélszolgálatához.
15. Az e-mailhez mellékelt hivatkozásra kattintva nyissa meg a webes alkalmazást, és tölts le a jelenleg feldolgozás alatt álló RSID-hez tartozó összes tesztjelentést.
16. Hiba esetén: A mintával kapcsolatos egyedi hiba vagy a rendszerhiba megoldásához kövesse a tesztjelentésben szereplő javaslatokat.
Megjegyzés: A mintákkal kapcsolatos egyedi hibák nem tekinthetők rendszerhibának.

12 HIBAEHÁRÍTÁS ÉS TESZTHIBÁK

7. táblázat: Hibakódok a teszt megismétléséhez

Hibakód	Hiba leírása	Javasolt teendő
5	Szkennelési hiba	A minta újrafuttatása 250 ng RNS-sel
7	Magas jel	A minta újraspecifikálása és a teszt újrafuttatása 125 ng RNS-sel
6	Alacsony jel	A minta újraspecifikálása és a teszt újrafuttatása 500 ng RNS-sel
30	Alacsony jel	A minta újraspecifikálása és a teszt újrafuttatása 500 ng RNS-sel
31	Alacsony RNS-jel	A minta újraspecifikálása és a teszt újrafuttatása 500 ng RNS-sel

A teszt megismétlésének okai:

1. A teszt sikertelensége esetén a tesztjelentésben szerepelni fog a hiba típusa és a javasolt teendő. Ha a minta tesztelése sikeres volt, a jelentésben a teszt eredmények szerepelnek.
2. A teszt sikertelensége esetén a tesztjelentésben szerepelni fog a hiba típusa és a javasolt teendő. A sikertelen minták RNS-koncentrációját ismét megmérheti és ismét futtathatja a mintákat (új tétel/RSID részeként) a hiba típusától és az RNS fennmaradó tömegétől függően a megfelelő teszt eredmény érdekében.

13 A TESZT EREDMÉNYEI

A Prosigna teszt számos minőség-ellenőrzési jellemzőt tartalmaz, amelyeket a berendezés az elemzés során automatikusan alkalmaz minden mintára. Ezek a jellemzők kiértékelik a teszt teljesítményét annak meghatározásához, hogy az eredmények a várt értékek közé esnek-e. A minőség-ellenőrzési jellemzők sikeres elemzése után a Prosigna teszt az alábbi eredményeket adja:

8. táblázat: A Prosigna teszt eredményei és kimenete

Eredmény	Kimeneti értékek
Az emlőrákminta intrinzik altípusa	Luminális A Luminális B HER2-dúsított Bazális szerű
A 10 éven belüli, távoli kiújulás valószínűségének egyéni becslése	0–100%
Kiújulási kockázati (ROR) pontszám	Egész szám érték 0–100 skálán
Kockázati kategória	Alacsony, Közepes, Magas

13.1 Intrinzik altípusok

Kimutatták, hogy az emlőtumor intrinzik altípusa kapcsolatban áll a korai stádiumú emlőrák előrejelzésével. A luminális A tumorban szenvedő betegeknek általánosságban jelentősen jobb az eredményeik, mint a luminális B, a HER2-dúsított vagy a Bazális szerű tumorban²⁵ szenvedőknek.

Az intrinzik altípus megállapításához összehasonlítják 50 gén expressziós profilját ismeretlen mintában a négy intrinzik altípus várt expressziós profiljaival. A leginkább hasonló profillal rendelkező altípust rendelik az ismeretlen mintához.

Az emlőrák leggyakoribb altípusai a luminális A (LumA) és a luminális B (LumB). Korábbi tanulmányok szerint az emlőrák körülbelül 30-40%-ban luminális A és körülbelül 20%-ban luminális B altípusú⁵. A hormonreceptor-pozitív betegek több, mint 90%-a azonban luminális tumorban szenved. A fenti altípusok génexpressziós mintája hasonlít az emlőszövet luminális epitheliális komponensére⁵. E tumorok jellemzői: ösztrogénreceptor (ER), progesteron receptor (PR) és az ER-aktiváláshoz kapcsolódó gének (például LIV1, GATA3, és ciklin-D1) magas expressziója, valamint a luminális cytokeatin 8 és 18 expressziója. A luminális A tumor a sejtciklus-aktiváláshoz kapcsolódó alacsonyabb génexpresszióval jár, mint a luminális B emlőrák, így jobb az előrejelzés.

A korábbi tanulmányok szerint a HER2-dúsított altípus (HER2-E) az emlőtumorsejtek körülbelül 20%-át teszi ki⁵. A HER2-dúsított tumorok azonban általában ER-negatívak, így a tesztelt ER-pozitív betegeknek csak 5%-nál diagnosztizáltak HER2-dúsított emlőrákot. A HER2-dúsított tumorok az ER-állapottól függetlenül az esetek nagy részében HER2-pozitívak az ERBB2 klaszter (beleértve az ERBB2-t és a GRB7-t) magas expressziójával. A sejtciklus-aktiváláshoz kapcsolódó gének szintén magas expressziójúak.

A közzétett adatok szerint a bazális szerű altípus az emlőtumorsejtek körülbelül 20%-át teszi ki⁵. A bazális szerű tumor azonban általában ER-negatív, így a hormonreceptor-pozitív betegeknek csak az 1%-a szenved bazális szerű emlőrákban. A bazális szerű altípus szinte mindig klinikailag HER2-negatív, és számos „bazális” biomarkert (például a bazális epitheliális cytokeatinok (CK) és az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)) expresszál. A sejtciklus-aktiváláshoz kapcsolódó gének magas expressziójúak.

13.2 ROR-pontszám

Az ROR-pontszám 0-100 skálán kifejezett egész szám érték, amely egy adott beteg esetében a 10 éven belüli, távoli kiújulás valószínűségét mutatja meg a definiált tervezett felhasználási populációban. Az ROR-pontszám számításához összehasonlítják egy ismeretlen mintában található 46 gén expressziós profilját a négy intrinzik altípus várható profiljával (a fent leírtak szerint) négy különböző korrelációs érték meghatározásához. Ezeket a korrelációs értékeket azután kombinálják a terjedési pontszámmal és a tumor bruttó méretével az ROR-pontszám kiszámításához.

13.3 10 éven belüli, távoli kiújulás valószínűsége

A menopauza utáni, hormonreceptor-pozitív, korai stádiumú emlőrákban szenvedő nők 2 kohorszának ROR-pontszámait összehasonlították a műtétet, 5 éves adjuváns endokrin terápiát és 5 éves megfigyelést követő távoli kiújulástól mentes túlélési értékekkel (részleteket a 16.4 Klinikai teljesítmény című fejezetben talál). E két tanulmány eredménye egy modell, amely az ROR-pontszámot összekapcsolja a távoli kiújulás valószínűségével a tesztelt betegek esetében, 95%-os konfidenciaintervallummal.

13.4 Kockázati besorolás

A kockázati besorolás szintén az ROR-pontszám értelmezésére szolgál a tesztelt betegek klinikai kimeneteléhez kapcsolódó határértékek (cutoff) használatával.

9. táblázat: Kockázati besorolás az ROR-tartomány és a csomóállapot alapján

Csomóállapot	ROR-tartomány	Kockázati besorolás
Csomó-negatív	0-40	Alacsony
	41-60	Közepes
	61-100	Magas
Csomó-pozitív (1-3 csomó)	0-15	Alacsony
	16-40	Közepes
	41-100	Magas
Csomó-pozitív (≥ 4 csomó)	0-100	Magas

13.5 Minőség-ellenőrzés

A Prosigna teszt komponenseinek minden tételét előre meghatározott specifikáció szerint tesztelték. A készletben található alkotórészek nyomon követhetőek, és az egyes készletek kritikus alkotórészeit együtt tesztelték és a Prosigna készlet tételeként adták ki.

A Prosigna teszt készlete számos belső vezérlőt tartalmaz, amelyek használatával kiértékelhető az egyes futtatási készletek minősége egyben és mintaként is. A vezérlők a lenti részben láthatók.

Tételenkénti ellenőrző szett: *In vitro* leírt RNS referenciaminta

A Prosigna teszt készletében megtalálható egy szintetikus RNS-referenciaminta ellenőrzésként. A referenciaminta *in vitro* leírt RNS-célokból áll (50 algoritmus és 8 háztartási génből). A referenciamintát a berendezés minden

Prosigna teszt futtatás esetében kétszer dolgozza fel 10 ismeretlen emlőtumor RNS-mintával együtt egy 12 reakciós csősorban. A referenciamintából származó jelet a berendezés összeveti az előre definiált küszöbértékekkel a futtatás minősítése céljából.

Az emlőtumor RNS-mintájának 50 algoritmus génjéből származó jel normalizálódik a referenciaminta megfelelő génjeire.

Pozitív ellenőrző szett: *in vitro* leírt RNS-célok és a megfelelő elfogó és riporter szondák

A szintetikus RNS-célokat a Prosigna teszt esetében pozitív kontrollként (PC) használják. A PC célszekvenciáit a külső RNS-szabályozó konzorcium (External RNA Control Consortium, ERCC) DNS-szekvenciakönyvtárából származtatják⁶. Az RNS-célokat *in vitro* leírják a DNS-plazmidokból. A teszt készletében hat RNS-cél található 4-szeres titráló sorozatban (128-0,125 fM végső koncentráció a hibridizálási reakcióban) a megfelelő elfogó és riporter szondákkal együtt. A PC-kezt hozzáadják az egyes emlőtumorsejtek Prosigna tesztjével tesztelt RNS-mintájához és referenciamintájához. Ha a PC-kekből származó jel intenzitása nem éri el az előre definiált küszöbértéket, a mintát kizárják a további elemzésből.

Negatív ellenőrző szett: exogén szondák célok nélkül

A negatív ellenőrző célszekvenciákat az ERCC DNS-szekvenciakönyvtárából származtatják⁶. Az ilyen célok észlelésére tervezett szondák megtalálhatók a teszt készletében a megfelelő célszekvencia nélkül. A negatív ellenőrzőket (negative control, NC) minőség-ellenőrzési intézkedésként hozzáadják az egyes emlőtumorsejtek Prosigna tesztjével tesztelt RNS-mintájához és referenciamintájához. Ha az NC-kekből származó jel intenzitása nem éri el az előre definiált küszöbértéket, a mintát kizárják a további elemzésből.

RNS integritásának ellenőrző szettje: Háztartási gének

A 8 háztartási és az 50 algoritmus gén észlelésére tervezett elfogó és riporter gének a Prosigna készlet részét képezik. A 8 háztartási gén expressziós szintjének elemzésével határozzák meg az FFPE-szövetmintából kivonatolt és a Prosigna tesztnek alávetett RNS minőségét. Ha a háztartási gének expressziós szintje nem éri el az előre definiált küszöbértéket, a mintát kizárják a további elemzésből.

A háztartási gének használatával normalizálják továbbá a sértetlen RNS mennyiségének bármilyen eltérését a referenciaminta normalizálása előtt.

14 AZ ELJÁRÁSOKKAL KAPCSOLATOS KORLÁTOZÁSOK

1. A Prosigna tesztet az emlőtumor intrinzik altípusának és a beteg 10 éven belüli, távoli kiújulási kockázatának (ROR-pontszám és kockázati kategória) azonosítására optimalizálták formalinban fixált, paraffinba ágyazott emberi emlőszövetből kivonatolt, megtisztított RNS felhasználásával. Más típusú mintákat és rögzítőket nem teszteltek, ezért azokat nem szabad használni.
2. A Prosigna teszt teljesítményét csak a csomag mellékletén található eljárásokkal ellenőrizték. Az ott szereplő eljárások módosítása megváltoztathatja a teszt teljesítményét.
3. A Prosigna teszt teljesítményjellemzőit menopauza utáni, hormonreceptor-pozitív, korai stádiumú emlőrákban szenvedő és 5 éves adjuváns endokrin terápiás kezelésben részesülő nőkre vonatkozóan állapították meg. A teljesítményt más kezelésekre és más betegek vonatkozásánál nem határozták meg.
4. Ha a teszt megadott RNS minősége vagy mennyisége nem megfelelő, előfordulhat, hogy a Prosigna teszt érvénytelen eredményt ad, és a teszt sikertelenségét jelzi.
5. A Prosigna teszt eredményeit (intrinzik altípus, ROR-pontszám, kockázati kategória) más klinikopatológiai tényezők, a beteg kórtörténete és más laboratóriumi teszt eredmények figyelembe vételével kell kiértékelni.
6. A Prosigna teszt teljesítményét a fenti eljárással definiált specifikációnak megfelelő RNS-re vonatkozóan határozták meg. Izolált, a fenti specifikációnak nem megfelelő RNS-re vonatkozó teljesítményt nem határozták meg.
7. A Prosigna tesztet ismerten megzavaró anyag például a genomális DNS és a nem tumoros (például normál) szövet. Az eljárás megkezdése előtt olvassa el a tesztrel kapcsolatos általános információkat. Az eljárás futtatása előtt patológusnak egyértelműen azonosítania kell az életképes invazív karcinómát. Az RNS-mintát továbbá DNase-zal kell kezelni. A beteg tesztmintáinak feldolgozása előtt a DNase minden új tételét tesztelni és minősíteni kell a kapott specifikáció alapján, ha nem Roche FFPET RNS-izolációs készletet használ.

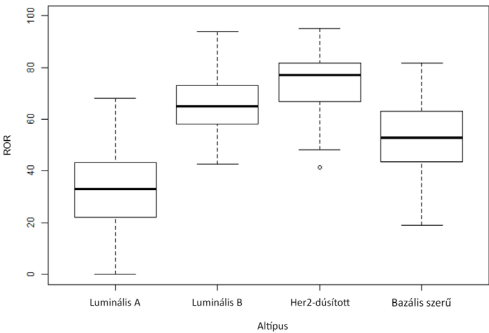
15 VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

A Prosigna teszt minden tumorminta esetében egy ROR-pontszámot (0-100), egy intrinzik altípust (luminális A, luminális B, HER2-dúsított vagy bazális szerű) és egy kockázati kategóriát ad eredményként. A lent ismertetett két klinikai ellenőrzési tanulmány alapján a menopauza utáni, HR+, korai stádiumú emlőrákban szenvedő, ATAC és ABCSG-8 vizsgálat során anasztrozollal és tamoxifennel kezelt nőkre vonatkozóan a 10. ábrán látható az ROR-pontszám tartománya és gyakorisága, a 11. ábrán az ROR és a távoli kiújulás valószínűsége közötti folyamatos összefüggés, a 9. ábrán pedig az ROR-pontszámok intrinzik altípusonkénti megoszlásának várható értéke. A klinikai ellenőrzési tanulmányok alapján a 10 évnél hosszabb, távoli kiújulástól mentes túlélés valószínűsége a 12. ábrán (csomó-negatív betegek) és a 13. ábrán (csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek) ábrán látható kockázati kategóriák szerint.

15.1 ROR-tartomány altípusok szerint

A 9. ábrán az ROR-pontszámok intrinzik altípusonkénti megoszlása látható.

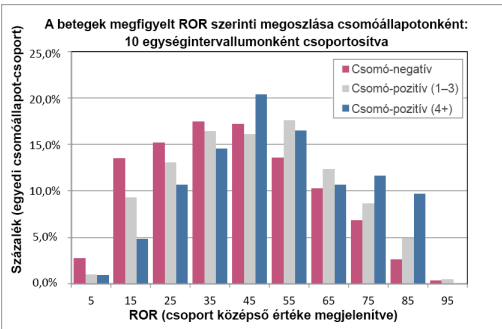
9. ábra: Az ROR-pontszámok megoszlása intrinzik altípusonként



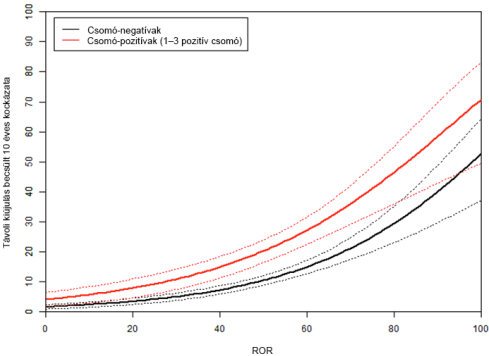
15.2 Az ROR-pontszámok gyakorisága csomóállapotonként

A 10. ábrán látható hisztogramot egyetlen Cox-moddal állították elő, amelyek során az ROR-pontszámot és a kategorikus változókat adták meg a három csomóállapot-csoport megkülönböztetéséhez.

10. ábra: Az ROR-pontszám és a csomóállapot-csoportok hisztogramja



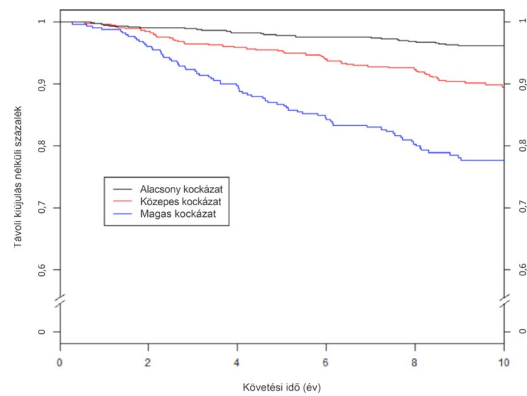
11. ábra: Tíz évre előre látható becslt kockázata csomóállapot-csoporton belül



15.3 Távoli kiújulástól mentes túlélés kockázati kategóriánként

Az alábbi adatok a TransATAC és a ABCSG-8 vizsgálat kombinált elemzéséből származnak. A betegek kockázati csoportokhoz rendeléséhez az ROR-pontszámokat összehasonlították az előre definiált kockázati küszöbértékekkel csomó-negatív és csomó-pozitív betegek esetében. A 12. és a 13. ábrán a 10 éves, távoli kiújulástól mentes túlélés valószínűsége látható az egyes kockázati kategóriákra vonatkozóan, csomóállapotonként.

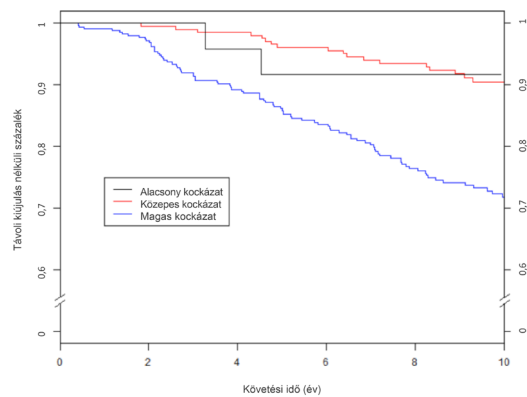
12. ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében



A 12. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	875 (49%)	31	96,2% [94,7%-97,3%]
Közepes	551 (31%)	53	89,2% [86,1%-91,7%]
Magas	360 (20%)	73	77,7% [72,8%-81,9%]
Összesen	1 786 (100%)	157	

13. ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében



A 13. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	24 (4%)	2	91,7% [70,6%-97,8%]
Közepes	211 (36%)	18	90,4% [85,2%-93,9%]
Magas	355 (60%)	87	71,8% [66,3%-76,6%]
Összesen	590 (100%)	107	

10. táblázat: Tíz éves DRFS-arányok 4 vagy több pozitív csomóponttal rendelkező betegeknél

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Magas	103	39	57,4% [46,3%-67,0%]

16 TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

16.1 Az elemzés pontossága és reprodukálhatósága

A Prosigna általános pontosságának és reprodukálhatóságának megbecsléséhez két tanulmány készült, és azok eredményét kombinálták. Az első tanulmány az nCounter elemző rendszer pontosságát vizsgálta kivont emlőtumor RNS-éből kiindulva, a második pedig a reprodukálhatóságot FFPE emlőtumorszövetből kiindulva, preanalitikus tényezőket is figyelembe véve.

Az RNS pontossága

16.1.1 A tanulmány felépítése

Három helyszínen vak és randomizált összehasonlító tanulmányt készítettek a Prosigna teszttel az nCounter elemző rendszeren az elemzés pontosságának kiértékeléséhez. Öt egyesített (pooled) emlőtumor RNS-mintát generáltak archivált FFPE-mintákból az egyes helyszíneken való teszteléshez. A mintapanel prototipikus gényexpressziós profilokat mutató rutin tesztelés során és az egyes kockázati besorolási csoportok esetében.

Minden helyszínen 18 érvényes futtatást végeztek (minden operátor 9 futtatást végzett, minden futtatás 10 tesztből állt), miután minden operátor elvégzett egy próbafuttatást (11. táblázat). Minden mintát duplikáltan teszteltek az egyes futtatások során a teszt névleges RNS bemeneti szintjén (250 ng). Minden operátor egy futtatást végzett egy adott napon a hosszú távú módszerek esetében általánosan elfogadott szabvány szerint⁷. A próbafuttatásokkal együtt a tanulmány teljes időtartama több, mint 4 hét volt minden helyszínen.

11. táblázat: Az RNS pontossági tanulmányának áttekintése

Tanulmány változója	Szám
Emlőtumor RNS-mintáinak száma	5
Minta ismétlődéseinek száma futtatásonként (azonos kazetta)	2
Futtatások száma helyszínenként	18
Futtatások száma naponta	1
Operátorok száma helyszínenként	2
Reagenstételek száma helyszínenként	3
Helyszínek száma	3
<i>Helyszínenként tesztelt minták száma összesen (a próbafuttatások nélkül) =</i>	<i>180</i>
<i>A minták száma összesen =</i>	<i>540</i>

16.1.2 Eltérés komponenseinek elemzése

A 12. táblázatban az egyes paneltagok eltéréskomponens-elemzésének eredménye látható. A táblázatban a becült eltérés a teljes eltérés százalékos értéke (zárójelben).

12. táblázat: Eltérés komponensei paneltag szerint (egyesített (pooled) RNS-minta)

Paneltag kockázat szerint, altípus	Átlagos ROR	Eltérés komponense					Teljes eltérés	Teljes SD
		Tétel	Helyszín	Operátor	Futtatás	Futtatás közbeni		
Alacsony Luminális A	31,4	0,010 (2%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (30%)	0,296 (67%)	0,44 (100%)	0,66
Közepes Luminális B	55	0,105 (18%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (8%)	0,426 (74%)	0,576 (100%)	0,76
Közepes bazális szerű	55,4	0,059 (20%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (15%)	0,194 (65%)	0,299 (100%)	0,55
Magas Luminális B	64,8	0,119 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,380 (66%)	0,576 (100%)	0,76
Magas HER2-dúsított	76,2	0,165 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (63%)	0,442 (100%)	0,66

A teljes SD mind az öt paneltag esetében kisebb volt, mint 1 ROR egység a 0-100 skálán. Az eltérés nagy része az összes paneltag esetében a futás közbeni eltérésből eredet (ismételhetőség). A helyszínek és az operátorok között szinte nem volt eltérés. A helyszín jelentőségének paneltagonkénti valószínűségiarány-tesztje kimutatta, hogy a helyszíni eltérések statisztikailag jelentéktelenek (p > 0,05) voltak. Az átlagos ROR-pontszám minden tétel esetében kisebb volt 1ROR egységnél, így az egyes paneltagok átlagosan körülbelül 20%-kal járultak hozzá a teljes eltéréshez.

16.1.3 A megállapított altípus és a kockázati besorolás egyezése

Minden paneltag esetében 100%-os egyezés volt az altípus eredménye és a paneltag intrinzik altípusa között. Minden minta esetében 100%-os egyezés volt a mért és a várható kockázati csoport között.

Szövet reprodukálhatósága

16.1.4 A tanulmány felépítése

Három helyszínen vak és randomizált összehasonlító tanulmányt készítettek a Prosigna teszttel az nCounter elemző rendszeren azonos FFPE blokkból vett emlőtumor-szövetminták replikátumának használatával. A tanulmány részeként 43, hormonreceptor-pozitív emlőrákos, megerősítetten invazív ductális és/vagy lobuláris karcinómával rendelkező betegről nemrég levett FFPE emlőtumormintát teszteltek. Minden szövetmintát a megfelelő helyszínre szállítottak feldolgozásra. A 43 mintát három különböző patológus egymástól függetlenül vizsgálta meg. Minden patológus által megvizsgált szövetmintán a szövet makrodisszekciójából, RNS-kivonatolásából és a Prosigna teszttel történő teszteléséből álló tesztet futtatott egyetlen operátor minden helyszínen a definiált tesztelési eljárással. Az szövetmintákból származó izolált RNS-t kétszer tesztelték különböző tesztfuttatások során. A tanulmány elvégzéséhez az RNS-izolációs készlet három tételét (helyszínenként egyet) és egyetlen tétel tesztkészletreagenst használtak. Egyetlen tárgylemezt helyeztek be az RNS kivonatolásához, ha a tumor mért felülete ≥ 100 mm² volt, és 3 tárgylemezt helyeztek be, ha a tumor mért < 100 mm²-nél kisebb volt (a minimális szükséges tumorfelület 4 mm² volt).

16.1.5 A teszt összefoglalása

A három helyszínen kiértékelt negyvenhárom (43) szövetminta hívási aránya a 13. táblázatban található.

13. táblázat: Hívási arány az egyes helyszíneken

Helyszín	Eredményes futtatások százalékos értéke	Megfelelt/összes
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

Negyven minta minden helyszínen eredmény adott (egy helyszínen egy minta RNS-izolációját meg kellett ismételni), 1 minta adott eredményt 2 helyszínen és 2 minta csak egyetlen helyen adott eredményt. A szövetvizsgálaton és az RNS-izoláció specifikációjának megfelelő minták száz százaléka (100%) adott megfelelt eredményt a Prosigna teszten. A 4/5 RNS-izolációs hibák esetében a mért tumorfelület ≤ 15 mm² volt, ami a tesztbe behelyezett 50 mm²-nyi teljes szövetterületnek felel meg.

A 43 minta csomó-negatív és csomó-pozitív betegek mintáit is tartalmazta. A 43 mintából számított teszteredmények az ROR-pontszámok széles tartományát (94 egység), mind a 4 intrinzik altípust és minden kockázati kategóriát lefedtek, amikor a csomó-negatív vagy a csomó-pozitív határértékeket (cutoff) minden mintára alkalmazták. Az egyetlen helyszínen eredményt adó két mintát kizárták minden további statisztikai elemzésből, mert nem állt rendelkezésre adat a helyszínek közötti összehasonlításhoz.

16.1.6 Eltérés komponenseinek elemzése

Nem volt statisztikailag szignifikáns (α = 0,05) eltérés a kockázati kategóriák között a nem paraméteres Kruskal-Wallis teszt használata esetén, ezért az eltérés komponenseinek modellje egyidejűleg az összes kockázati kategóriára illeszkedett.

A 14. táblázatban az eltéréskomponens-elemzés eredményei láthatók mind a 41 szövetminta használatával.

14. táblázat: Eltérés komponensei (szövet reprodukálhatósági tanulmánya)

Eltérés komponensei				Teljes SD
Helyszín	Blokkon belüli	Maradvány	Összesen	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

A helyszín komponens a szisztematikus helyszínspecifikus eltérést, a „Blokkon belüli” komponens a véletlenszerű eltérést (amely a szövetminta vizsgálati vagy feldolgozási eljárása miatt vagy az FFPE blokkeltérése miatt mutat eltérést), a maradvány eltérés pedig a Prosigna teszt futtatások közötti és futtatáson belüli kombinált változékonyságát méri. A helyszín komponens nagyon kicsi a blokkon belül a véletlenszerű változékonysághoz viszonyítva, ami azt jelzi, hogy a helyszínek közötti eltérések általánosan elhanyagolhatók (a teljes eltérés < 1%-a). A maradvány eltérése konzisztens volt az RNS pontossági tanulmánya során mérttel megegyező változékonysággal, de ott kevesebb minta és több replikátummérés volt (0,51 eltérés az átlaghoz képest egy helyszínen a Prosigna reagenskészletének 0,39-es eltérésén belül az RNS pontossági tanulmánya esetében).

A 15. táblázatban a teljes változékonyság látható a szövet teljes feldolgozási változékonyságának használatával (a tanulmány 14. táblázatában szereplő helyszín és blokkon belüli komponens), illetve az RNS teljes feldolgozási változékonysága az RNS pontossági tanulmányból (a 12. táblázatban szereplő öt tesztelt panelt átlagolva). A szövETFeldolgozáshoz tartozó preanalitikus tényezők a teszt eltéréseinek elsődleges forrása (a teljes eltérés 94%-a). A teljes SD az eltérés összes forrását beleértve 2,9, ami azt jelzi, hogy a Prosigna a két 6,75-os ROR érték közötti eltérés (95%-ban) megbízható mérőszáma.

15. táblázat: Teljes változékonyság (szövet és RNS feldolgozása)

Szövet feldolgozásának változékonysága	RNS feldolgozásának változékonysága	Teljes változékonyság	Teljes SD
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 A kockázati kategória és az altípus-besorolás egyezése

A beteg altípusának és kockázati besorolásának (alacsony/közepes/magas kockázat) helyszínek közötti egyezése a 16. táblázatban látható, ahol a csomó-negatív és a csomó-pozitív besorolások megfelelő kockázati határértékeit (cutoff) alkalmazták minden mintára. A pontos típusú, 95%-os konfidenciaintervallumok szögletes zárójelben, a mindkét helyszínen eredményt adó minták száma pedig sima zárójelben látható. Az átlagos egyezés az utolsó oszlopban található. Minden összehasonlítás esetében az egyezést két lépésben számították ki. Először kiszámították minden szövetminta esetében a négy lehetséges eredménypár (kettő az 1-es helyszínen * kettő a 2-es helyszínen) egyezésének arányát. A második lépésben az arányokat átlagolták az összes szövetmintára, amely mindkét helyszínen eredményt generált az adott összehasonlítás során.

16. táblázat: Altípus és kockázati kategória egyezésének összesítése csomóállapot szerint

Összehasonlítás típusa	Páronkénti egyezés			Átlagos egyezés
	1. helyszín/ 2. helyszín (n = 40)	1. helyszín/ 3. helyszín (n = 41)	2. helyszín/ 3. helyszín (n = 40)	
Altípus	96,3% [86,4%-99,5%]	98,8% [91,0%-100%]	95% [83,1%-99,3%]	97%
Kockázati kategória Csomó-negatív	87,5% [73,2%-95,8%]	92,7% [80,1%-98,4%]	90% [76,4%-97,2%]	90%
Kockázati kategória Csomó-pozitív	88,8% [75,9%-96,0%]	92,7% [80,1%-98,4%]	91,3% [79,2%-97,4%]	91%

A helyszínek közötti átlagos egyezés minden összehasonlítás esetében (altípus és csomó-negatív és -pozitív kockázati kategóriák) legalább 90% volt. Nem volt olyan minta, amely esetében a kockázati kategória alacsony kockázatról magas kockázatra (vagy fordítva) változott a helyszínek között vagy azokon belül. Csak két minta volt (a 41-ből), amely a 6 replikátum esetében nem azonos altípust adott:

1. Egy minta kétszer luminális A eredményt adott az egyik helyszínen és kétszer luminális B eredményt a két másik helyszínen.
2. Egy minta kétszer luminális A eredményt adott az egyik helyszínen, kétszer HER2-dúsított eredményt egy másik helyszínen és egyszer-e egyszer luminális A és HER2-dúsított eredményt a harmadikon.

16.2 Érzékenység / RNS-bemenet

RNS-bemeneti tanulmány leírása

A tanulmányban 13 emlőtumor RNS-mintát teszteltek három RNS-bemeneti szinten a teszt specifikációján belül (500, 250 és 125 ng) és két további RNS-bemeneti szintet a specifikáción kívül (625, 62,5 ng). Minden mintát a készlet összes tételével teszteltek (összesen 2 tétel) egyetlen tesztfuttatásban, amelynek során minden szinten két mérést végeztek a specifikáción belül és minden szinten egy mérést a specifikáción kívül. Minden tesztfuttatásban volt ismétlődő üres (vagyis cél nélküli) mérés. Egy mintát csak egy tétellel teszteltek.

RNS-bemeneti tanulmány eredményei

Minden mért üres minta (n = 46) jele jóval a küszöbérték alatt volt, és sikertelen teszt eredményt (0%-os hívási arány) adott. Minden teszt specifikáción belül végzett RNS-mérés (n = 138) megfelelt teszt eredményt (100%-os hívási arány) adott. A specifikáció feletti (625 ng) bemenettel rendelkező minták száz százaléka (100%) megfelelt teszt eredményt adott. A specifikáció alatti (62,5 ng) bemenettel tesztelt minták (10/12) nyolcvanhárom százaléka (83%) esetében az 1. tétel teszt eredménye 100%-ban megfelelt a 2. tétel eredményeinek.

A 13 minta átlagos ROR-pontszáma széles tartományt (20–82) fedett le. A kockázati csoport besorolása (alacsony/közepes/magas) 100%-ban

egyezett a 13 tesztelt minta minden RNS bemeneti szintjén. A 17. táblázatban az ROR-pontszám eltérése látható az RNS-bemenet függvényében. Az ROR-pontszám RNS bemeneti szintek közötti átlagos eltérését, az eltérések SD értékét és a 90%-os konfidenciaintervallumot használták annak kiértékelésére, hogy a különböző RNS bemeneti szinteken generált ROR-pontszámok megegyeztek-e a 250 ng célszint használatával generáltakkal. Az elfogadási kritérium eléréséhez a konfidenciaintervallumnak teljesen a (-3,3 ROR) tartományba kellett esnie. A két szinten, a teszt specifikációtartományának szélső értékeinél (125 és 500 ng RNS) az ROR-pontszám megegyezett a 250 ng cél bemeneti koncentráció mellett számított pontszámmal mindkét tesztelt készlettel esetében. A teszt specifikációján kívüli szintek esetében az ROR-pontszámok megegyeztek az egyik tétel értékével, de a másikéval nem.

17. táblázat: ROR-pontszám eltéréseinek összesítése (a darabszám az elemzéshez használt minták számának felel meg)

Készlet-tétel	Tömeg (ng)	Darab-szám	ROR átlagos eltérése	Eltérés SD értéke	Alsó megbízhatósági határérték	Felső megbízhatósági határérték
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

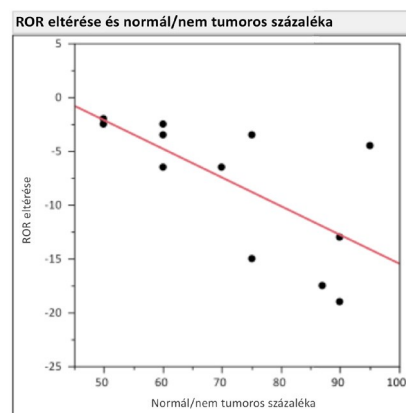
16.3 Interferencia tesztelése

Egymás melletti normál/nem tumoros szövet

Egymás melletti normál/nem tumoros szövet általában FFPE emlőtumorblokkokban található, és patológiai vizsgálat során mutatható ki az invazív emlőrák területétől elkülönülő területeként. A Prosigna teszt fenti eljárása meghatározza az egymás melletti normál szövet makrodisszekcióval történő eltávolítását. Annak kiértékeléséhez, hogy a normál szövet mekkora szennyeződési kockázatot jelent a teszt eredményekre, összesen 13, patológiaiilag megerősített, infiltráló ductális karcinómát tartalmazó emlőtumorblokkot és körülbelül 50–95% környező normál/nem tumoros szövetet teszteltek a környező szövet makrodisszekciójával és anélkül, és meghatározták az ROR-pontszám eltérését (delta ROR).

A makrodisszekált tumorminta ROR-pontszáma átlagosan majdnem 8 ROR egységgel magasabb volt, mint a normál/nem tumoros szövet eltávolítása nélküli esetben. A 14. ábrán az látható, hogy a normál szövet mennyiségének növekedésével (95%-os makrodisszekcióval el nem távolított értékig) növekszik annak kockázata, hogy a jelzett ROR-pontszám a beteg kiújulási kockázatának alábecsült vagy negatívan elfogult (akár -19 ROR egység) becsült értéke lesz.

14. ábra: A normál/nem tumoros szövet hatása az ROR eltérésére



Nekrotikus, vérzéses és DCIS szövet interferenciája

Annak kiértékeléséhez, hogy a nekrotikus/vérzéses/DCIS szövet mekkora szennyeződési kockázatot jelent a teszt eredményekre, összesen 11, patológiaiilag megerősített, invazív emlőkarcinómát és körülbelül 10–30% beavatkozó anyagot tartalmazó FFPE emlőtumorblokkot (3 DCIS, 5 nekrotikus, 3 vérzéses) teszteltek a beavatkozó anyag makrodisszekciójával és anélkül, és meghatározták az ROR-pontszám eltérését (delta ROR). A tesztelt szinteken az eljárás során használt vérzéses, DCIS és a nekrotikus szövet elhanyagolható hatással volt az eredményként kapott ROR-pontszámra (< 6 ROR egység). A kockázati kategória meghatározása során 100%-os egyezés volt a tizenegy nekrotikus, vérzéses és DCIS minta között makrodisszekcióval és anélkül.

Emberi genomális DNS

A Prosigna teszt eljárásának része az emberi genomális DNS (gDNS) eltávolítása DNase I használatával történő feloldással. Annak kiértékeléséhez, hogy a gDNS mekkora szennyeződési kockázatot jelent a teszteredményekre, tíz (10) patológiailag megerősített, infiltráló ductális karcinómát tartalmazó FFPE emlőtumorblokkot teszteltek az emberi genomális DNS eltávolításával és anélkül, az eljárás DNase lépésének kihagyásával. A tesztelt mintákban az ROR-pontszám átlagosan 4-5 egységgel alacsonyabb volt az Alacsony és a Közepes kockázati csoportban, ha a gDNS-t DNase I használatával eltávolították (lásd a 18. táblázatot). Amikor a DNase-kezelést nem kapott mintákat később DNase I használatával kezelték (utókezelés), az ROR-pontszám megegyezett a protokoll szerinti DNase-kezelés mellett eredetileg megfigyelhető ROR-értékekkel. Fennáll a kockázata, hogy gDNS jelenlétében a beteg kiújulási kockázatának eredményként kapott ROR-pontszáma túlbecsült vagy (akár 7 ROR egységgel) pozitívan elfogult lesz. A DNase I-kezelést nem kapott mintákhoz kiszámított jel továbbá jelentősen ($p < 0,05$) alacsonyabb a DNase I-kezelést kapottaknál a Prosigna teszt előtt az RNS mennyiségének meghatározásához használt leolvasott abszorpció interferenciája miatt.

18. táblázat: A DNase-kezelés hatása az ROR-pontszámra tumormintákban

ROR Kategória	Tesztelt FFPE- minták	ROR eltérése DNase I-gyel - DNase I nélkül			ROR eltérése DNase I-gyel - DNase I nélkül (utókezelés)		
		Átlagos	Minimális	Maximális	Átlagos	Minimális	Maximális
Alacsony	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Közepes	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Magas	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinikai teljesítmény

Két klinikai ellenőrző tanulmányt készítettek a Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prosigna emlőrák prognosztikus genetikai aláírás tesztje) ellenőrzésére. Mindkét tanulmány elsődleges célja a közzétett megfigyelések ellenőrzése volt, amelyek szerint a kiújulási kockázat (ROR) pontszáma további prognosztikus információt ad a 10 éves, távoli kiújulástól mentes túléléssel kapcsolatban a szabványos klinikai változókon túl. Mindkét tanulmány esetében egy másodlagos célkitűzés is volt annak a korábbi megfigyelésnek az igazolására, hogy a luminális A és a luminális B betegek statisztikailag szignifikánsan eltérő távoli kiújulástól mentes túlélési kockázati értékkel rendelkeznek 10 éves időtávon. Mivel a két tanulmány belépési kritériumai és eredményei hasonlóak voltak, a két adatbázist kombinálták, és prospektív módon definiált elemzési tervvel elemezték, amelynek az egyes tanulmányokkal azonos volt a célkitűzése.

Kombinált elemzés: Kockázati görbék generálása a Prosigna teszt TransATAC és ABCSG-8 vizsgálatból származó kombinált eredményeinek használatával

A kombinált elemzésből származó kezelés és klinikai jellemzők összefoglalása a lenti részben található. Az egyes tanulmányok felépítési és elemzési információit az alábbi szakaszok 1-es és 2-es tanulmányra vonatkozó részében találja.

Elemzés

19. táblázat: A kezelés és a klinikai jellemzők összesítése az 1-es és a 2-es tanulmány kombinált elemzésében

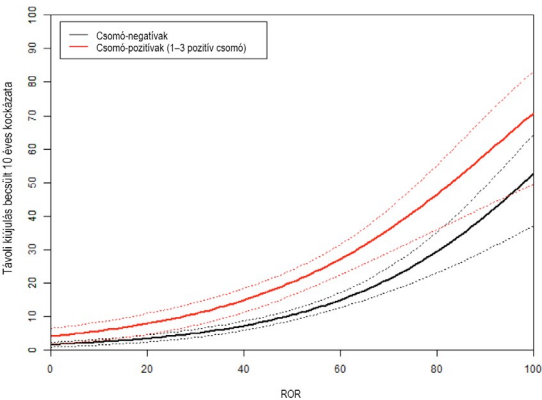
Jellemzők	Érték	Csomó-negatív (n = 1786)		1-3 pozitív csomó (n = 590)		≥ 4 pozitív csomó (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Kezelés	Kevés anasztrozol	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Csak tamoxifen	362 (49,0%)	519 (49,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
Fokozat	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%)
Tumor mérete	≤ 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-állapot	Negatív	649 (87,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	367 (96,1%)	47 (87,0%)	46 (93,9%)
	Pozitív	90 (12,2%)	63 (6,0%)	22 (10,6%)	15 (3,9%)	7 (13,0%)	3 (6,1%)
Kiújulások	Távoli	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Bármely	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	73 (19,1%)	34 (63,0%)	10 (20,4%)
NanoString intrinzik altípus	Luminális A	529 (71,6%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Luminális B	176 (23,8%)	284 (27,1%)	68 (32,7%)	118 (30,9%)	20 (37%)	16 (32,7%)
	Bazális szerű	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2- dúsított	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Mindkét tanulmány 5 éves tamoxifenes kezelést vett alapul. A TransATAC esetében a tanulmány másik ága 5 éves anasztrozolkezelést, míg az ABCSG-8 tanulmányban a második ág 2 éves tamoxifen-, majd 3 éves anasztrozolkezelést tartalmazott. Amikor a DR-t az összes klinikai és kezelési változó függvényeként modellezték, a kezelés nem járult hozzá jelentős mértékben ($p = 0,66$) a DR előrejelzéséhez. A vizsgálatok közötti másik fő különbség az volt, hogy a TransATAC vizsgálat 3-as fokozatú tumorban szenvedő betegeket tartalmazott, és hogy az általános kiújulási arány a TransATAC tanulmány esetében nagyobb volt, mint az ABCSG-8 tanulmány esetében.

Eredmények

A 15. ábrán a DR 10 éves kockázata látható az ROR-pontszám függvényében 95%-os megbízhatósági sávokkal a különálló Cox-féle arányos hazárd modell alapján, az összes csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegcsoportra vonatkozóan.

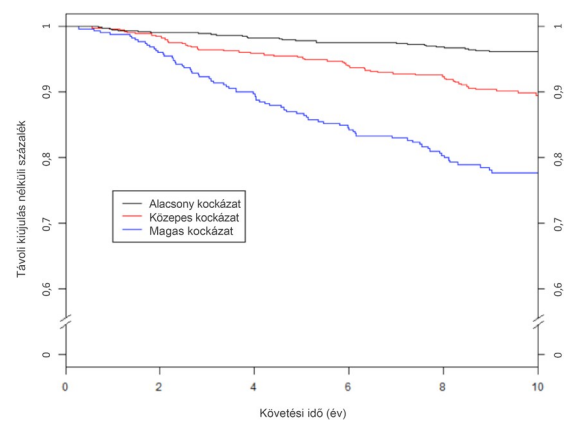
15. ábra: Tíz éves becsült DR-kockázat csomóállapotonként 95%-os konfidenciaintervallumokkal



A 16. ábrán a Kaplan-Meier görbe és az előfordulási forgatókönyvek láthatók kockázati csoport szerint a csomó-negatív betegek esetében, a 17. ábrán pedig ugyanazok a forgatókönyvek csomó-pozitív betegek (1-3 csomó) esetében.

A mintaméretek részletei, az események száma és a becült százalékos érték (10 éves, távoli kiújulás nélkül) minden ábrán kockázati csoport szerint látható. A csomó-pozitív betegcsoportban túl kevés beteg volt az előre definiált alacsony kockázatú csoportokban, ennek eredményeként a Kaplan-Meier görbe konfidenciaintervalluma és így a DRFS 10 éves becslése túlságosan széles lett.

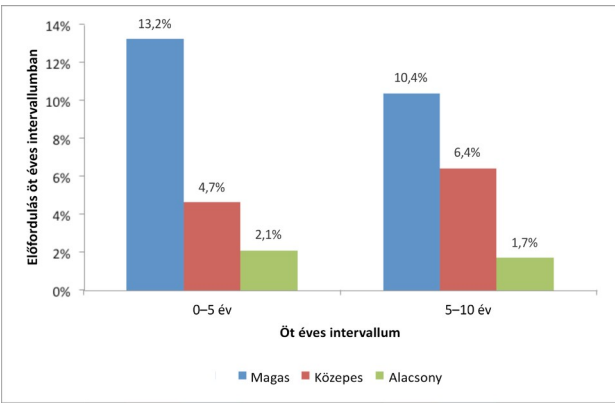
16A ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében



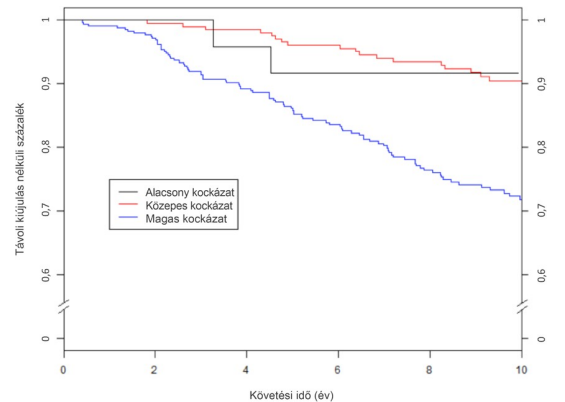
A 16A ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	875 (49%)	31	96,2% [94,7%-97,3%]
Közepes	551 (31%)	53	89,2% [86,1%-91,7%]
Magas	360 (20%)	73	77,7% [72,8%-81,9%]
Összesen	1 786 (100%)	157	

16B ábra: Előfordulás kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében, öt éves intervallumra



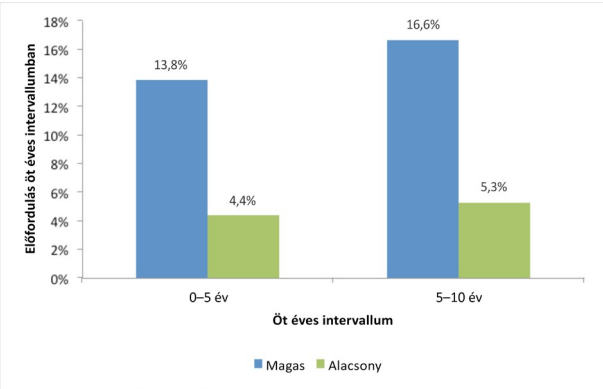
17A ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegek esetében



A 17A ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	24 (4%)	2	91,7% [70,6%-97,8%]
Közepes	211 (36%)	18	90,4% [85,2%-93,9%]
Magas	355 (60%)	87	71,8% [66,3%-76,6%]
Összesen	590 (100%)	107	

17B ábra: Előfordulás kockázati csoportonként csomó-pozitív betegek (1-3 csomó) esetében, öt éves intervallumra



A 17B ábrán (mivel csak 24 beteg volt 2 eseménnyel az alacsony kockázatú csomó-pozitív csoportban) a betegeket kombinálták a közepes kockázatú betegekkkel a késői kiújulás elemzéséhez.

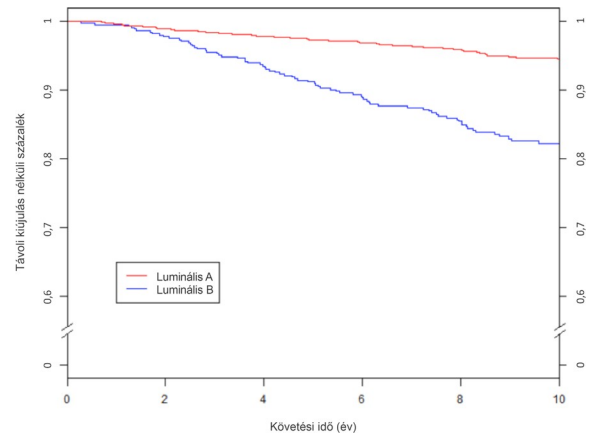
A kombinált adatbázisban található mind a 103, 4 vagy több pozitív csomóval rendelkező beteget magas kockázatúként sorolták be. A 20. táblázatban ezen betegek tíz éves DRFS-aránya látható.

20. táblázat: Tíz éves DRFS-arányok 4 vagy több pozitív csomóponttal rendelkező betegeknél

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Magas	103	39	57,4% [46,3%-67,0%]

A kombinált tanulmányokban részt vevő alanyok nagy része (96%) luminális A vagy luminális B típusú volt. A 18. ábrán a DRFS összehasonlítása látható luminális altípusonként, csomó-negatív betegek esetében.

18. ábra: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-negatív betegek esetében

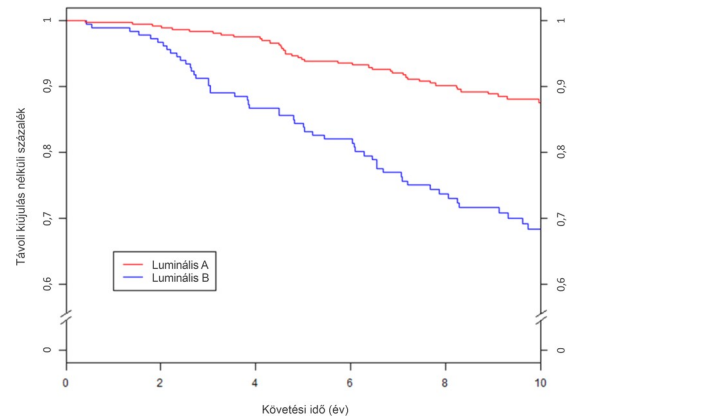


A 18. ábra adatainak összesítése: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Luminális A	1254	62	94,6 [93,1-95,8]
Luminális B	460	75	81,9 [77,7-85,3]
Összesen	1714	137	

A 19. ábrán az 1-3 pozitív csomóval rendelkező csomó-pozitív betegek ugyanazon összehasonlítása látható. Mindkét csoport esetében jelentős eltérések voltak a luminális A és a luminális B betegek DRFS-e között.

19. ábra: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegek esetében



A 19. ábra adatainak összesítése: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Luminális A	375	41	87,6 [83,5-90,8]
Luminális B	186	52	68,3 [60,4-75,0]
Összesen	561	93	

Csak 98 olyan luminális altípusú beteg volt a kombinált adatbázisban, akinek 4 vagy több pozitív csomója volt. A 21. táblázatban ezen betegek tíz éves DRFS-aránya látható, akiknél a kockázat sokkal magasabb luminális B altípus esetén.

21. táblázat: Tíz éves DRFS-arányok 4 vagy több pozitív csomóponttal rendelkező betegeknél luminális altípus szerint

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Luminális A	62	17	68,3 [53,6-79,3]
Luminális B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
Összesen	98	37	

Utolsó kiújulás elemzése

Az előzőekben ismertetett kombinált elemzési adatok között az események aránya nem konstans az egyes kockázati csoportokban a 10 éves intervallumban, mint a 16B és a 17B ábrán látható. A DR jobb megértéséhez a késői kiújulási időszakban elvégezték a fent ismertetett kombinált adatok post-hoc retrospektív elemzését azon betegekre vonatkozóan, akik öt évig távoli kiújulástól mentesek voltak (összesen 2163 beteg). E betegek közül 1605 csomó-negatív, 488 pedig csomó-pozitív (1-3 csomó volt). A 20. és a 21. ábrán az x tengely alatti értékek 5 évnél minden csomócsoport esetében a betegek számát mutatják kockázati csoportonként az öt évnél érvényes kockázattal, ami megfelelő a kései kiújulás elemzéséhez.

A 22. táblázatban a csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek kezelésének és klinikai jellemzőinek összesítése látható a kései kiújulás elemzésében.

22. táblázat: Kezelések és klinikai jellemzők összesítése kései kiújulás elemzéséhez

Jellemzők	Érték	Csomó-negatív (n = 1,605)		Csomó-pozitív (1-3 csomó) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Kezelés	Kevés anasztrozol	480	346	153	89
	Csak tamoxifen	464	315	158	88
Fokozat	Jó	192	158	46	36
	Közepes	752	394	265	105
	Gyenge	0	109	0	36
Tumor mérete	≤ 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-állapot	Negatív	888	590	300	157
	Pozitív	56	71	11	20
Kiújulások	Távoli	41	40	28	29
	Bármely	71	78	37	37
NanoString intrinzik altípus	Luminális A	674	488	218	112
	Luminális B	245	150	87	54
	Bazális szerű	4	5	0	1
	HER2-dúsított	21	18	6	10

Az elsődleges cél annak meghatározása volt, hogy az ROR-pontszám képes-e szignifikáns további prognosztikai információt adni a DRFS számára a szabványos klinikai változók túl 5 vagy 10 éven belül. A csak CTS-t tartalmazó null modellt összehasonlították egy CTS-ből és ROR-ból álló alternatív modellel a valószínűségi arány (LR) teszt használatával. Az ROR statisztikailag szignifikáns információt adott az 5 éven túli DRFS esetében a szabványos klinikai változók túl minden beteg (p < 0,0001) esetében, a csomó-negatív (p < 0,0001) és a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek (p < 0,0001) is.

A 23. táblázatban a kockázati arányok összesítése látható 10 pontos változás esetében, egyváltozós elemzés alapján, illetve az ROR-pontszámot és a CTS-t is tartalmazó többváltozós elemzésben. Az ROR-pontszám kockázati arányai mind jelentősen eltérnek 1-től, még a CTS módosítása után is. A C-indexek szintén a 22. táblázatban láthatók. A C-index mindkét csoport esetében jelentősen eltért az információmentes értéktől (0,5).

23. táblázat: Kései kiújulás tesztelésének összefoglalása

Pozitív csomók száma	N	Kockázati arány: 10 pontos ROR-pontszám változás		C-Index 95%-os konfidenciaintervallumokkal		
		Egyváltozós elemzés	Többváltozós elemzés	C-Index	Alsó	Felső
0	1605	1,38 [1,23-1,54]	1,29 [1,15-1,46]	70,1%	64,7%	75,5%
1-3	488	1,43 [1,25-1,63]	1,34 [1,16-1,53]	71,1%	64,0%	78,3%

A tanulmányban szereplő betegek nagy része HER2-negatív volt. A 24. táblázatban a HER2-állapot megoszlása látható a csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 csomó) nőkre vonatkozóan. A tanulmányokban szereplő nők több, mint 90%-a mindkét csoport esetében HER2-negatív volt.

24. táblázat: A HER2-állapot megoszlása a pozitív csomók száma szerint

Beteg alcsoportja	HER2-állapot		Összesen
	Negatív	Pozitív	
Csomó-negatív betegek	1478 (92,1%)	127 (7,9%)	1605
Csomó-pozitív betegek (1-3 pozitív csomó)	457 (93,6%)	31 (6,4%)	488

A 25. táblázatban az összes betegre alkalmazott többváltozós modell összehasonlítása látható egy adott csomócsoportban és a csoportba tartozó összes HER2-negatív betegre alkalmazott modell. Nincs statisztikailag szignifikáns eltérés.

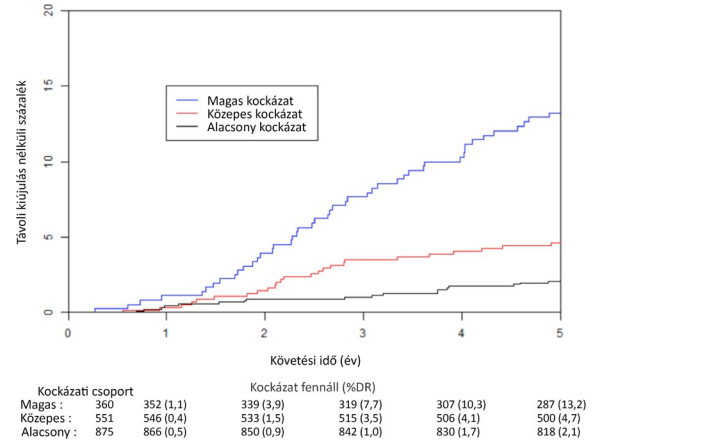
25. táblázat: Többváltozós kockázati arányok 10 pontos ROR-pontszám változás esetén: Az alcsoportba tartozó összes beteg / az alcsoportba tartozó HER2-negatív betegek

Pozitív csomók száma	Az összes beteg [95% CI]	HER2-negatív betegek [95% CI]
Csomó-negatív betegek	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Csomó-pozitív betegek (1-3 pozitív csomó)	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

A kockázati csoportok közötti összehasonlítást a 20. és a 21. ábra részletezi tovább, ahol a csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek korai és kései távoli kiújulásának előfordulási görbéi is láthatók kockázati csoport szerint. Az előfordulási görbék a korai kiújulási időszakot (az első 5 évben) és a kései kiújulási időszakot (a diagnózist követő 5-10 évben) is lefedik. Minden ábrán az x tengely alatt a veszélyeztetett nők száma és az összesített előfordulás látható. Az ábrák alatti összesítő táblázatok az összesített DR-arány konfidenciaintervallumát mutatják 5 vagy 10 évre vonatkozóan azon nők esetében, akik az 5 éves kezelést követően DR-mentesek voltak. A 21. ábrán látható csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében az Alacsony kockázati csoportba tartozó betegek alacsony száma miatt kombinálták az Alacsony és a Közepes kockázati csoportot.

Az Alacsony kockázati csoportba tartozók esetében alacsony a kiújulás valószínűsége 5-10 éven belül 5 éves endokrin terápiát követően, mint az összesített előfordulási görbék és az egyes kockázati csoportok kockázati arányai mutatják. Ezzel szemben a Közepes és a Magas kockázati csoportba tartozók esetében tartósan fennáll a kései távoli kiújulás kockázata 5 éves endokrin terápiát követően. A Közepes és a Magas kockázatú csomó-negatív betegek eredménye közötti eltérés az első 5 évben alakul ki (DR-arány =13,2% [9,6%-16,7%] a magas kockázatú és 4,7% [2,9%- 6,4%] a közepes kockázatú betegek esetében), és 10 évig fennáll. A Közepes és a Magas kockázati csoport kiújulási aránya azonban 5 éves endokrin terápia után nagyon hasonló.

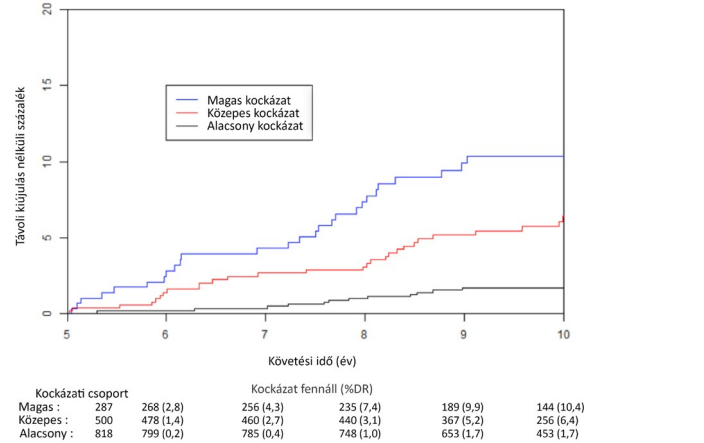
20A ábra: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 0-5 év: Csomó-negatív betegek



A 20A ábra adatainak összesítése: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 0-5 év: Csomó-negatív betegek

DR-arányok kockázati csoport szerint a kezelés befejezésétől számított öt évig [95%-os konfidenciaintervallumok]		
Magas	Közepes	Alacsony
13,2% [9,6%-16,7%]	4,7% [2,9%-6,4%]	2,1% [1,1%-3,1%]

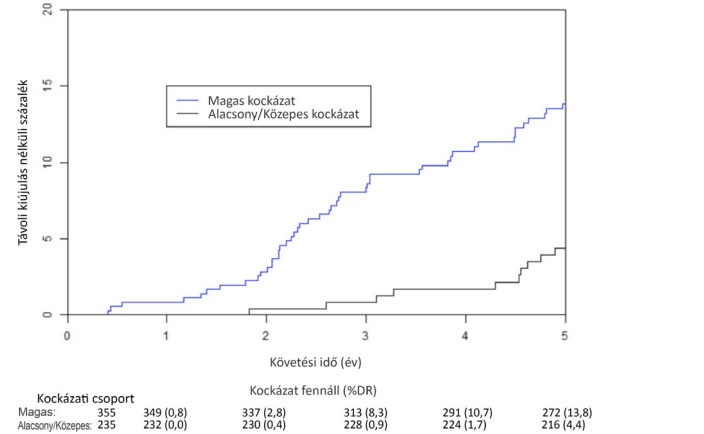
20B ábra: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 5-10 év: Csomó-negatív betegek



A 20B ábra adatainak összesítése: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 5-10 év: Csomó-negatív betegek

DR-arányok kockázati csoportonként öt évvel a kezelés DR-mentes befejezése után [95%-os konfidenciaintervallumok]		
Magas	Közepes	Alacsony
10,4% [6,6%-14%]	6,4% [4,1%-8,7%]	1,7% [0,8%-2,6%]

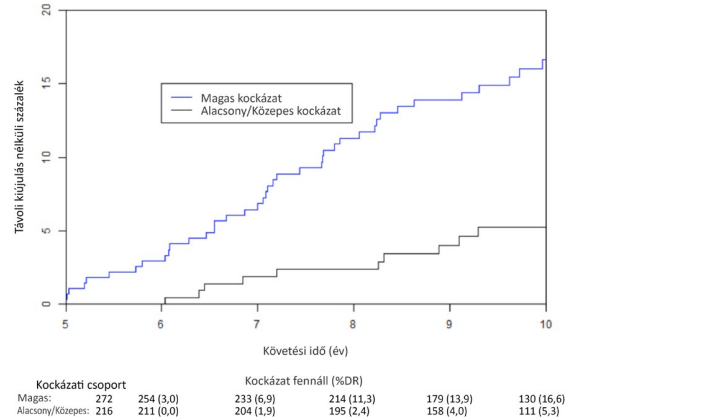
21A ábra: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 0-5 év: Csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek



A 21A ábra adatainak összesítése: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 0-5 év: Csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek

DR-arányok kockázati csoport szerint a kezelés befejezésétől számított öt évig [95%-os konfidenciaintervallumok]	
Magas	Alacsony / Közepes
13,8% [10,1%-17,4%]	4,4% [1,7%-7,0%]

21B ábra: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 5-10 év: Csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek



A 21B ábra adatainak összesítése: Távoli kiújulás előfordulási görbéi kockázati csoport szerint, 5-10 év: Csomó-pozitív (1–3 csomó) betegek

DR-arányok kockázati csoportonként öt évvel a kezelés DR-mentes befejezése után [95%-os konfidenciaintervallumok]	
Magas	Alacsony / Közepes
16,6% [11,7%–21,3%]	5,3% [2,0%–8,4%]

A kombinált elemzés következtetése

Az öt évig távoli kiújulástól mentes betegek kombinált tanulmánya kimutatta, hogy az ROR-pontszám szignifikáns prognosztikus információt ad hozzá a diagnózist követő 5 és 10 év közötti kései kiújulási időszakhoz és a szabványos klinikai változókön túl. A kiinduláskor a csomószámspecifikus kohorszokhoz definiált kockázati csoportokkal kapcsolatosan kimutatták, hogy az összes, szignifikánsan eltérő kései távoli kiújulási kockázattal rendelkező betegcsoport besorolására alkalmasak. A folyamatos és az ROR-pontszámra alapuló kockázati csoport elemzése hasonló prognosztikus információt adott a különböző alcsoportokra vonatkozóan. A HER2-negatív betegek eredményei és az összes beteg eredménye között nem volt tapasztalható anyageltérés.

Az ROR-pontszám a TransATAC és a ABCSG-8 tanulmány esetében is szignifikáns prognosztikus információt adott hozzá a szabványos klinikai és kezelési változókön túl, amikor azt folyamatos mérőszámként és három előre definiált kockázati csoporttal alkalmazták. A két tanulmány eltérő kockázati profilal rendelkezett abban az értelemben, hogy az események aránya magasabb volt a TransATAC tanulmány esetében, mint az ABCSG-8 tanulmány esetében: ez érthető az ATAC (90.8%) és az ABCSG8 (92.5%) ellenőrző ágához tartozó, a szakirodalomból ismert DRFS (%) összehasonlításával^{9, 10}. Ez az elemzés a két tanulmány adatait kombinálta egyenlő súllyal a kockázati profilok létrehozásához, amelyek várhatóan jobban általánosíthatók más betegekre vonatkozóan, mint az egyes tanulmányok eredményei.

1. tanulmány: Menopauza utáni, csomó-negatív vagy csomó-pozitív, hormonreceptor-pozitív, korai stádiumú emlőrákban szenvedő, arimidexszel vagy tamoxifennel kezelt nők távoli kiújulási kockázatának előrejelzése: TransATAC tanulmány

A tanulmány felépítése

A klinikai ellenőrző tanulmányt annak ellenőrzésére tervezték, hogy a kiújulás kockázati pontszáma (ROR) további prognosztikus információt ad-e a távoli kiújulástól mentes túléléssel (DRFS) kapcsolatosan a szabványos klinikai változókön túl, az összes rendelkezésre álló betegmintát felhasználva. A tanulmányhoz FFPE emlőtumorszövetből izolált RNS-t használtak, amely az ATAC vizsgálatban részt vevő beteg alcsoportjától származott¹¹. Az ATAC vizsgálat során 9366 beteget vizsgáltak három ágon (1:1:1), ahol a betegek randomizált módon 5 évig endokrin terápiát (1 mg anasztrozolt, vagyis arimidexet) és tamoxifen placebót, 20 mg tamoxifent és anasztrozol placebót vagy a tamoxifen és az arimidex kombinációját kaptak. A kombinált kezelést a kezdeti elemzés után leállították, mert nem mutatott nagyobb hatékonyságot vagy tolerálhatóságot, mint a tamoxifen különálló alkalmazása. Az ATAC vizsgálat ágának 10 éves medián követése során nemrég kimutatták, hogy az megfelel az FDA biztonsági és hatékonysági információra vonatkozó módosított követelményeinek⁹. Hormonreceptor-pozitív betegek esetében a DFS jelentősen javult (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79), és DRFS (HR = 0,85) az anasztrozollal kezelt betegek esetében a tamoxifennel az elemzés során összevetve. A távoli kiújulástól mentes túlélés anasztrozol és tamoxifen közötti abszolút eltérése idővel 2,7%-ról (5 év) 4,3%-ra (10 év) nőtt. A TransATAC projektet 2002-ben kezdték a TA/O1 protokollnak megfelelően ATAC betegekből származó, archiv hisztopatológias FFPE blokkokból álló szövetbank retrospektív létrehozása céljából¹¹.

Összesen 2006 blokkot vettek le 4160 hormonreceptor-pozitív emlőrákban szenvedő nőtől, akiket randomizáltak az ATAC vizsgálat egyes monoterápiás ágaiba. Az FFPE blokkokból 1372-t egyesült királyságbeli betegektől vettek le, és azok között megfelelő mennyiségű invazív tumor volt a Genomic Health® Oncotype Dx® teszttel történő elemzéshez¹². Az Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) pontszámot az FFPE blokkok alapján állapították meg, és a tanulmány eredményei klinikailag igazolták, hogy az RS pontszámmal megbecsülhetők a HR+, menopauza utáni, emlőrákban szenvedő, anasztrozollal vagy tamoxifennel kezelt betegek becsült távoli kiújulástól mentes túlélési esélyei. Az Oncotype Dx tanulmányból fennmaradó RNS-t a londoni Royal Marsden Hospital kórházba szállították, ahol -70 °C-on tárolták azt. Az Oncotype Dx tanulmányban érintett összesen 1017 beteg esetében több, mint 500 ng RNS maradt meg, és azt a NanoString klinikai ellenőrzési tanulmánya keretében tesztelték.

Ehhez a tanulmányhoz a teszt által eredményként adott intrinzik altípusokat használták, és az ROR-pontszám két verzióját értékelték ki az előre definiált szekvenciális megközelítéssel. A két különböző ROR-pontszámot, amelyek mindegyike 0-100 közötti érték, mind az 50 tesztgén (a korábban közzétettek² szerint) vagy egy 46 génés alcsoport használatával számították ki. Az együtthatókat mindkét esetben Cox-modellből számították ki, amely tartalmazza a Pearson-féle korrelációt az egyes intrinzik altípusok, a terjedési pontszám és a tumorméret kiszámításához használt 50 vagy 46 génre vonatkozóan. Minden elemzést 10 éves követési adatokkal végeztek.

Az elsődleges végpont a távoli kiújulástól mentes túlélés (DRFS) volt. Ezt a diagnózis és a távoli kiújulás vagy az emlőrák miatti halál közötti intervallumként definiálták. A másodlagos végpont a kiújulásmentes túlélés (RFS) volt. Ezt a diagnózis és az első kiújulás (helyi, regionális vagy távoli) vagy az emlőrák miatti halál közötti intervallumként definiálták.

Az összes betegminta felhasználásával többváltozós Cox-féle arányos hazárd (PH) modell készítették az elsődleges célkitűzés kiértékelésére az ROR 50 vagy 46 gén lapján végzett szekvenciális tesztjeiben. A modellben szerepeltették a szabványos klinikai kovariánsokat (kor, tumor fokozata, tumor mérete, csomóállapot és adjuváns terápia). Ezután alkalmazták a Cox-modellt, és egy valószínűségárány-teszttel megállapították, hogy az ROR statisztikailag szignifikáns mértékben ($\alpha = 0,05$) további prognosztikus információt adott hozzá a klinikai kezelési pontszámában (CTS) foglalt értékekhez. A CTS a klinikai kutató által szabványos patológiai intézkedésként kifejlesztett klinikopatológiai tényezők optimalizált kombinációja¹². Az elsődleges elemzéseket megismételték a különböző betegalcsoportokra (mind, csomó-negatív, csomó-pozitív és csak HER2-negatív) és végpontokra (DRFS és RFS).

Minden csomó-negatív és csomó-pozitív beteg esetében Cox-modellt (a CTS kivételével) használtak a DR 10 éves kockázatának előrejelzéséhez az ROR függvényében. A modell előrejelzései alapján az alábbi három kockázati csoportot definiáltak:

Alacsony kockázat:	< 10% esély DR-re 10 éven belül
Közepes kockázat:	10-20% esély DR-re 10 éven belül
Magas kockázat	> 20% esély DR-re 10 éven belül

Elemzés

Minden kockázati csoporthoz Kaplan-Meier forgatókönyvet generáltak. Az Isődleges elemzésben ismertetett valószínűségárány-tesztet (amely két statisztikai modell illeszkedésének összehasonlítására szolgál) a Genomic Health Oncotype Dx tesztre (RS, kiújulási pontszám) és az elsődleges kutatói immunhisztokémia-alapú tesztre (IHC4) végezték el. Ezek eredményeit összehasonlították az ROR-pontszámhoz kapott értékekkel annak meghatározásához, hogy az egyes pontozási rendszerek milyen mértékben nyújtanak további prognosztikus információt a CTS-en túl. Az IHC4 eredményeit nem tárgyalják tovább, mert azok nehezen összehasonlíthatók más tesztekkel, mivel az IHC4 tesztet a TransATAC tanulmány adatainak felhasználásával dolgozták ki.

26. táblázat: Demográfiai és klinikai jellemzők összesítése

Jellemzők	Aktuális tanulmány (n = 1007)		A kezdeti tanulmány, amelyből az RNS származik (n = 1231)	Az ATAC egyágenses ágai nem szerepelnek (n = 2929)
	Betegek száma	Betegek százalékos értéke		
Csomóállapot				
Negatív	701	70%	71%	68%
Pozitív	268	27%	25%	25%
Ismeretlen	38	4%	4%	7%
Tumor mérete				
≤ 1 cm	138	14%	67%	70%
1–2 cm	523	52%		
2–3 cm	253	25%	33%	30%
> 3 cm	93	9%		
Tumor fokozata				
Jó	213	21%	27%	25%
Közepes	601	60%	57%	59%
Gyenge	193	19%	16%	17%
Kor				
Átlagos	64,4 év		64,3	66,1

27. táblázat: További klinikai jellemzők

Jellemzők	Betegek száma	Betegek százalékos értéke
Altípus		
Bazális szerű	9	1%
HER2-dúsított	41	4%
Luminális A	692	69%
Luminális B	265	26%
Kezelés		
Anasztrozol	513	51%
Tamoxifen	494	49%
Kiújulások		
Bármely	210	21%
Távoli	160	16%
HER2-állapot		
Negatív	888	88%
Pozitív	119	12%

Eredmények

Az elsődleges elemzés tesztelése kimutatta, hogy az ROR-pontszám további prognosztikus információt nyújt a távoli kiújulástól mentes túléléshez a szabványos klinikai változókon túl (CTS). Az alábbi összes ROR-adat 46 génen alapul, mivel a Prosigna teszt eredményeként ez az ROR alapja.

28. táblázat: Az ROR elsődleges elemzési tesztelése

Null modell	Alternatív modell	Δ LR χ^2	χ^2 p-érték
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

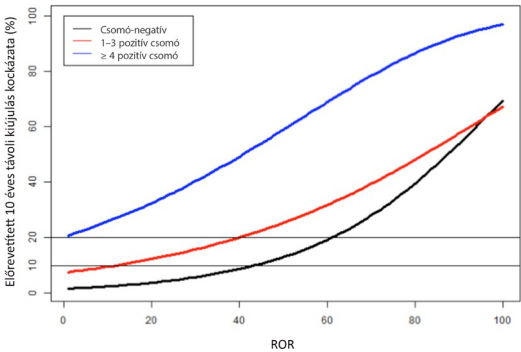
A másodlagos elemzés kimutatta, hogy az ROR szignifikáns összefüggésben áll a távoli kiújulástól mentes túléléssel, és a CTS-en túli prognosztikus információt nyújt több klinikailag releváns alcsoport esetében.

29. táblázat: Az elsődleges elemzési teszt megismétlése előre definiált alcsoportokra

Tárgycsoport	Végpont	Betegek száma	Események száma	CTS+ROR / CTS	
				Δ LR χ^2	χ^2 p-érték
Mind	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negatív	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Csomó-negatív	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Csomó-pozitív	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-negatív csomó-negatív	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

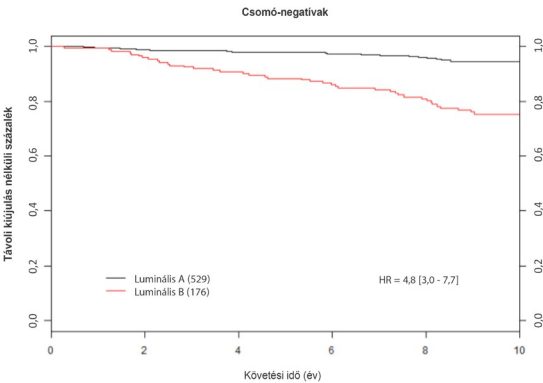
Az elsődleges és a másodlagos elemzés kimutatta, hogy az ROR folyamatosan összefüggésben állt a DRFS-sel minden beteg esetében és minden alcsoportban.

22. ábra: Tíz éves előre jelzett kiújulási kockázat az ROR-pontszám elemzésével megbecsülve, a csomóállapot-csoporton belül

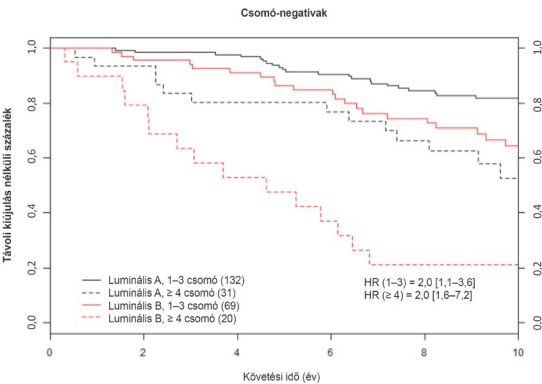


Másodlagos elemzések kimutatták, hogy a luminális A és a luminális B altípus statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményt adott minden csomóállapot alapján definiált betegalcsoportban.

23. ábra: Kaplan-Meier görbék csomó-negatív betegek DRFS-éhez intrinzik altípus szerint

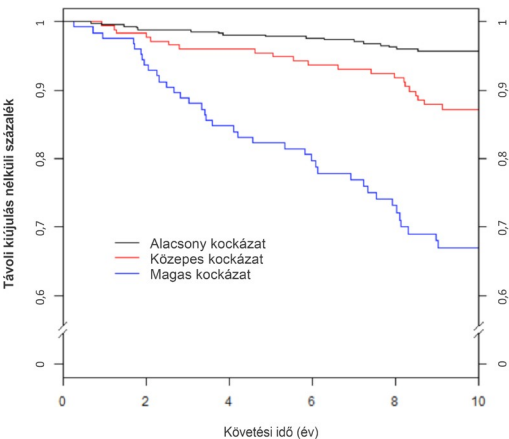


24. ábra: Kaplan-Meier görbék csomó-pozitív betegek DRFS-éhez intrinzik altípus szerint



A 25. és a 26. ábrán az látható, hogy az egyes csomókategóriákban az alacsony kockázatra előre jelzett betegek abszolút klinikai kockázata lényegesen eltér a magas kockázatra előre jelzett betegek abszolút klinikai kockázatától: az alacsony kockázatra előre jelzett betegeknél a 10 éves DR-arány kisebb volt, mint 10%, míg a magas kockázatra előre jelzett betegek esetében a 10 éves DR-arány 30%-nál nagyobb volt.

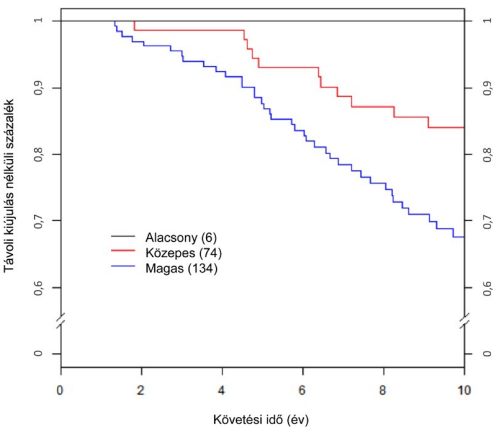
25. ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében, CTS kizárásával



A 25. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében, CTS kizárásával

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	Események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	431 (58%)	17	96% [94%-98%]
Közepes	180 (24%)	22	86% [81%-92%]
Magas	128 (17%)	38	67% [59%-76%]
Összesen	739 (100%)	77	

26. ábra: DRFS kockázati csoport szerint 1-3 csomóval rendelkező betegek esetében, CTS nélkül



A 26. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoport szerint 1–3 csomóval rendelkező betegek esetében, CTS nélkül

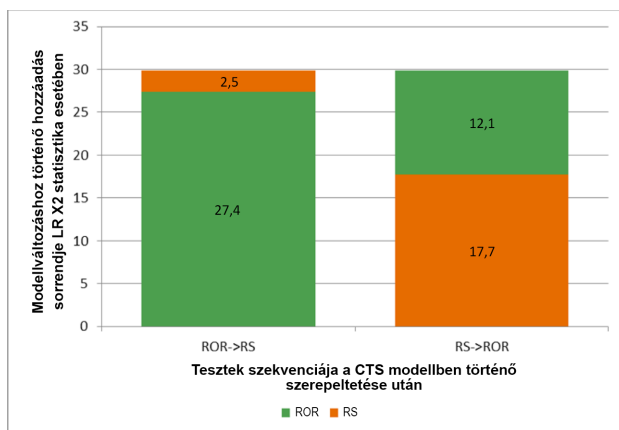
Kockázati csoport	Betegek száma (%)	Események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	6 (3%)	0	100% [N/A]
Közepes	74 (35%)	11	84% [76%–93%]
Magas	134 (63%)	38	68% [59%–77%]
Összesen	214 (100%)	49	

Az ROR és az RS összehasonlítása

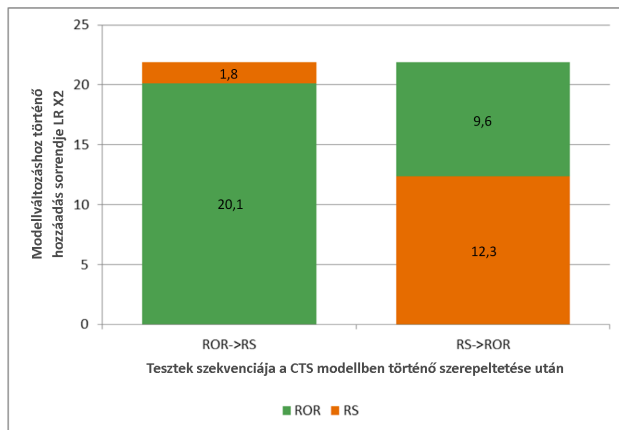
Az ROR-pontszámmal rendelkező 1007 minta közül az Oncotype Dx teszteredményei mind az 1007 mintához rendelkezésre álltak, de az IHC eredményei csak 940 mintához. A három teszt összehasonlításához az ebben a szakaszban szereplő eredmények azon a 940 mintán alapulnak, amelyek mindhárom módszer esetében eredményt adtak (bár az IHC4 itt nem szerepel). A valószínűségiarány-tesztek esetében egyetlen változót adtak hozzá, így ahhoz, hogy a hozzáadott információ statisztikailag szignifikáns ($\alpha = 0,05$) legyen, az 1 szabadságfokú χ^2 statisztikában a változásnak kötelezően nagyobbak kell lennie mint 3,84. Az alábbi ábrák a hozzáadott információt mutatják, amikor a prognosztikus tesztet hozzáadták egy másik prognosztikus teszthez és a CTS- hez szekvenciában. Az egyes hozzáadások alkalmával a hozzáadott információ az χ^2 változásával mérhető.

ROR hozzáadva az RS-hez a CTS mellett: prognosztikus információ

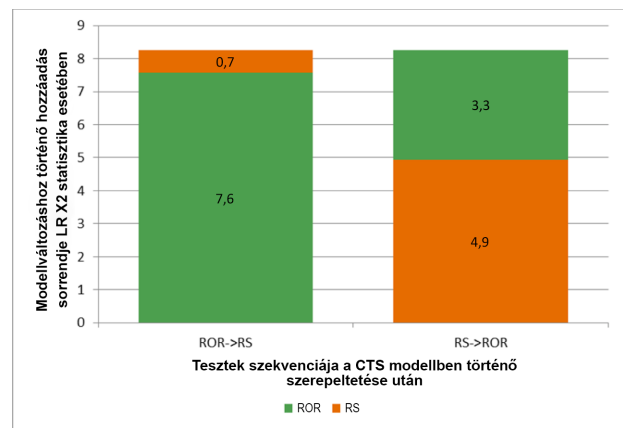
27. ábra: ADRFS prognosztikusinformációja a CTS-en túl, minden beteg esetében (n = 940)



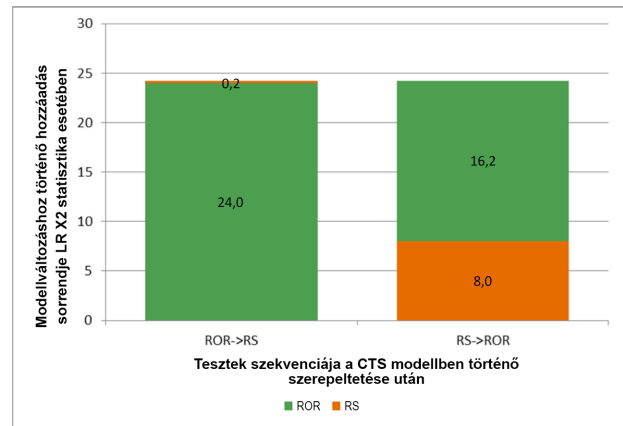
28. ábra: A DRFS prognosztikus információja a CTS-en túl, csomó-negatív betegek esetében (n = 683)



29. ábra: A DRFS prognosztikus információja a CTS-en túl, csomó-pozitív betegek esetében (n = 257)



30. ábra: A DRFS prognosztikus információja a CTS-en túl, csomó-negatív, HER2-negatív betegek esetében (n = 649)



A 27–30. ábra a CTS-en felül hozzáadott információt mutatja meg a két prognosztikus teszt szekvenciában történő hozzáadásakor. Az egyes hozzáadások alkalmával a hozzáadott információ az χ^2 statisztika változásával mérhető. Ha például az ROR volt az első hozzáadott teszt a CTS (minden beteg adata) hozzáadása után, az χ^2 statisztika változása 27,4 volt. Ha a modellben szerepel a CTS és az ROR, az RS hozzáadása 2,5 értékű változást idézett elő az χ^2 statisztikában, ami nem szignifikáns (az χ^2 teszt kritikus értéke 1 fokos szabadság mellett 3,84); vagyis amikor a modellben a CTS és az ROR is szerepel, az RS nem ad hozzá szignifikáns információt. Ha azonban az RS volt az első hozzáadott teszt, az ROR-ben még volt információ, amely a CTS és az RS kombinációjában nem szerepelt. Mindkét teszt prognosztikusan szignifikáns, ha a CTS-hez adják csomó-pozitív betegek esetében, de egyik sem szignifikáns másodikként hozzáadott tesztként, valószínűleg a kisebb mintaméret miatt. A csomó-negatív, HER2-negatív betegcsoport esetében az RS nem ad szignifikáns prognosztikus információt a CTS + ROR értékéhez. Másrészt az ROR szignifikáns prognosztikus információt ad a CTS + RS értékéhez.

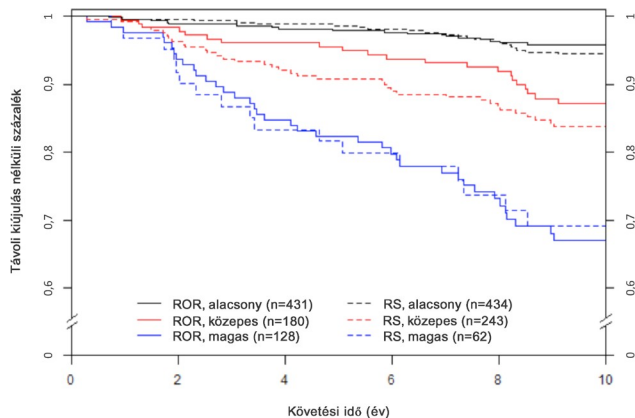
ROR / RS: a kockázati csoportok eredménye

Annak összehasonlításához, hogy a két teszt hogyan választotta külön a betegeket kockázat szerint, kockázati csoportokat definiáltak az egyes tesztek 10 éves becült távoli kiújulási kockázata alapján a TransATAC betegek belől. A kockázati csoportok definiálásához használt kockázati pontszám-küszöbértékeket a TransATAC tanulmányunk eredményei alapján választottuk ki minden teszthez, így definiálva az azonos kockázati besorolású betegeket tartalmazó kockázati csoportokat. Ezen összehasonlítható kockázati csoportok létrehozásához az Oncotype DX teszthez használt vágási pontok eltértek a Genomic Health által használtaktól. Az alacsony kockázatú csoportot minden teszt esetében prospektív módon, a 10%-nál kisebb becült kiújulási kockázatú betegekként definiálták. A közepes kockázatú csoportot minden teszt esetében prospektív módon, a 10% és 20% közötti becült kiújulási kockázatú betegekként definiálták. A magas kockázatú csoportot minden teszt esetében prospektív módon, a 20%-nál nagyobb becült kiújulási kockázatú betegekként definiálták. Az alábbi ábra az egyes tesztek által definiált kockázati csoportok méretét és eredményét összesíti.

A 31. ábrán az látható, hogy a Prosigna 26%-kal kevesebb beteget rendelt a közepes kockázati csoporthoz, mint az Oncotype DX (180 beteg/243 beteg). A Prosigna továbbá több beteget rendelt a magas kockázati csoportba, mint az Oncotype DX, az egyes tesztek által definiált alacsony és a magas kockázati csoportok azonban hasonló eredményt adtak, mint azt a Kaplan-Meier görbék átfedése illusztrálja.

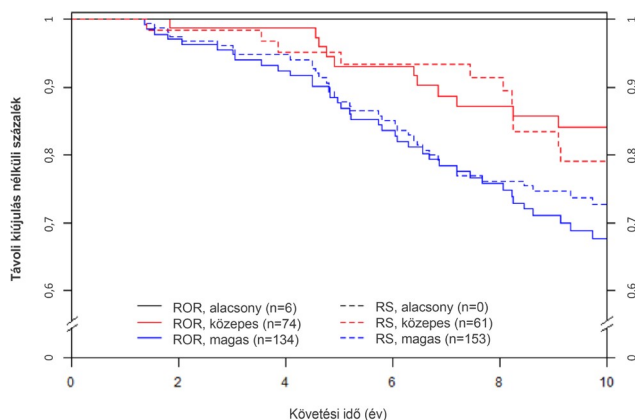
E megfigyelés alapján a TransATAC tanulmányunk független kutatói arra következtettek, hogy a Prosigna kevesebb beteget rendelt a közepes kockázati csoportba, mint az Oncotype DX RS, és az alacsony és a magas kockázati csoport közötti eltérés pedig azonos vagy nagyobb.

31. ábra: A Prosigna ROR-pontszáma a csomó-negatív betegek közül lényegesen több magas kockázatú és kevesebb közepes kockázatú beteget azonosított, mint az Oncotype DX RS-pontszáma.



Amikor csak az ROR-pontszámot használták 1–3 pozitív csomóval rendelkező csomó-pozitív betegek esetében, 6 beteg volt, akinél a távoli kiújulás kockázata 10%-nál kisebb volt. A betegek egyikénél sem fordult elő esemény a tanulmány során. A betegek egyikét 7,9 évig figyelték, az összes többinél nem volt DR a legalább 9,9 éves követés során, ami azt jelzi, hogy az alacsony kockázatúként előre jelzett csomó-pozitív betegek valóban alacsony kockázatúak voltak. A log-rank tesztek nem használtak összehasonlításához, mert az RS-hez nem tartozott alacsony kockázatú csoport.

32. ábra: 10 éves DRFS kockázati csoportbeli besorolás összehasonlítása CTS használata nélkül: Csomó-pozitív betegek (1–3 csomó) (ROR / RS)



Az 1. klinikai tanulmány következtetései

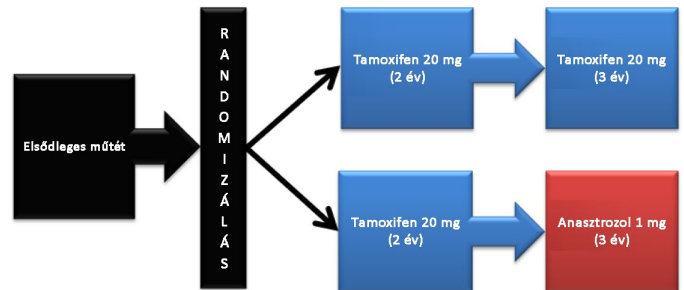
Az elsődleges elemzés kimutatta, hogy az ROR szignifikáns prognosztikus információt adott a szabványos klinikai kovariánsokhoz (CTS) minden beteg és minden előre definiált, klinikailag releváns alcsoport esetében. Az ROR a betegeket 3 kockázati csoportra osztotta, amelyek statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményt mutattak a csomó-negatív betegek esetében. A lúminális A és a lúminális B intrinzik altípus szignifikánsan eltérő DRFS-t és RFS-t eredményezett a csomóállapottól függetlenül. Az RS prognosztikus jelzővel (az Oncotype Dx teszttel számítható 21 génes kiújulási pontszám) összehasonlítva az ROR prognosztikus információt adott az RS-hez minden beteg és minden klinikailag releváns alcsoport esetében. A csomó-negatív csoportban továbbá az ROR megkétszerezte a magas kockázati csoportba tartozó betegek számát, és lényegesen csökkentette a közepes kockázati csoportba tartozókat anélkül, hogy az RS-hez viszonyítva csökkentette volna az alacsony és a magas kockázati csoportok közötti eredményt.

2. tanulmány: Prognózis hormonreceptor-pozitív, menopauza utáni, emlőrákos betegeknek, akik csak adjuváns szisztémás endokrin terápiában részesülnek a Prosigna teszt használatával: ABCSG-8 tanulmány

A tanulmány felépítése

A tanulmány kohorsza az ABCSG tumorbankban az ABCSG-8 vizsgálatra 1996 és 2004 között felvett betegektől retrospektíven gyűjtött és archivált FFPE emlőtumor-szövetmintákból áll¹³. Összesen 3901 menopauza utáni, HR+, korai stádiumú emlőrákkal diagnosztizált nő mintáit a kezelés előtt randomizálták két éves adjuváns tamoxifen, majd három és Arimidex® (anasztrozol) vagy öt év adjuváns tamoxifen kezelést kapott beteg mintáival. A vizsgálat kezelési struktúrája a 33. ábrán látható.

33. ábra: Az ABCSG-8 vizsgálati tanulmány felépítésének vázlata



A vizsgálati kohorsz a kiértékelhető ABCSG-8 kohorsz egy részének felel meg, amelyhez a szövetminták gyűjthetők a retrospektíven archivált ABCSG tumorbankból, és amelyhez tájékoztatott belegegyezést szerezhető, vagy a beteg elhunyt. Az eredeti vizsgálat feltételeinek megfelelő betegeket csak azért zárták ki, mert a NanoString tesztjének elvégzéséhez nem volt megfelelő a szövet, vagy a beteg ismételt hozzájárulása nem volt kérhető. Minden olyan mintát teszteltek a tanulmány részeként, ahol volt tumorblokk, és a beteg belegegyezése kérhető volt.

Ehhez a tanulmányhoz a teszt által eredményként adott intrinzik altípusokat használták, és az ROR-pontszámot értékelték ki az előre definiált elemzési terv használatával. A 0–100 közötti ROR-pontszámot a korábban közzétett 50 tesztgén 46 génes alcsoportjának használatával számították ki². Az ROR együtthatóit Cox-modellből számították ki, amely tartalmazza a Pearson-féle korrelációt az egyes intrinzik altípusok, a terjedési pontszám és a bruttó tumorméret meghatározásához használt 46 génre vonatkozóan. Minden elemzést maximális követési adatokkal végeztek.

Az elsődleges végpont a távoli kiújulástól mentes túlélés (DRFS) volt. Ezt a diagnózis és a távoli kiújulás vagy az emlőrák miatti halál közötti intervallumként definiálták. A másodlagos végpont a kiújulásmentes túlélés (RFS) volt. Ezt a diagnózis és az első kiújulás (helyi, regionális vagy távoli) vagy az emlőrák miatti halál közötti intervallumként definiálták.

Az összes betegminta felhasználásával többváltozós Cox-féle arányos kockázat (PH) modell készítették az elsődleges célkitűzés kiértékelésére az ROR szekvenciális tesztjeiben. A modellben szerepeltették a szabványos klinikai kovariánsokat (kor, tumor fokozata, tumor bruttó mérete, csomóállapot és adjuváns terápia). Ezután alkalmazták a Cox-modellt, és egy valószínűségiarány-teszttel megállapították, hogy az ROR statisztikailag szignifikáns mértékben ($\alpha = 0,05$) további prognosztikus információt adott hozzá a klinikai kezelési pontszámhoz (CTS) foglalt értékekhez. A CTS a klinikai kutató által szabványos patológiai intézkedésként kifejlesztett klinikopatológiai tényezők optimalizált kombinációja¹². Az elsődleges elemzéseket megismételték a különböző betegalcsoportokra (mind, csomó-negatív, csomó-pozitív és csak HER2-negatív) és végpontokra (DRFS és RFS).

Elemzés

Szekvenciális megközelítést alkalmaztak, amelynek során az elsődleges tudományos célkitűzés annak igazolása volt, hogy az ROR szignifikáns prognosztikus információt nyújt a szabványos klinikai változókban túl. Az elsődleges célkitűzés miatt felmerült a további követelmény annak igazolása, hogy a háromcsoportos (alacsony/közepes/magas) kockázati besorolás szignifikáns prognosztikus információt nyújt a szabványos klinikai változókban túl. E követelmény teljesítéséhez az alábbiak közül mindkettőt igazolni kell:

- A folyamatos ROR-pontszám prognosztikus értéket nyújt a szabványos klinikai változókban túl
- Ha a null hipotézis (nincs prognosztikus információ) nem igazolódik, azt kell igazolni, hogy az ROR-alapú kockázati kategóriák prognosztikus értéket nyújtanak a szabványos klinikai változókban túl

Az összes betegminta felhasználásával többváltozós Cox-féle arányos kárárd (PH) modellt készítettek az elsődleges célkitűzés kiértékelésére az ROR szekvenciális tesztheiben, majd meghatározták az előre definiált ROR-alapú kockázati kategóriákat. A modellek az alábbi kategorikus szabványos klinikai kovariánsokat tartalmazták (a lehetséges értékekkel):

- Kor (≥ 65 vagy < 65)
- Fokozat (G1 vagy G2/GX)
- Tumor bruttó mérete (T1, T2/T3)
- Csomóállapot (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- Adjuváns terápia (csak tamoxifen vagy tamoxifen → anasztrozol)

ahol az N0 a csomó-negatív betegeket, az N+(1-3) csomó-pozitív betegeket (1-3 pozitív csomó), az N+(≥ 4) pedig a csomó-pozitív betegeket (4 vagy több pozitív csomó) jelöli. A T1 ≤ 2 cm átmérőjű tumort, a T2 2 cm-nél nagyobb, de 5 cm-nél nem nagyobb átmérőjű tumort, a T3 pedig 5 cm-nél nagyobb átmérőjű tumort jelöl. A tanulmányban csak 14 T3 minta volt, ezért ezeket kombinálták a T2 mintákkal. A jól differenciált (G1) tumorokat összehasonlították a közepesen differenciált (G2) és a GX lobuláris tumorok kombinációjával. A GX lobuláris tumorokat G2 tumorként kezelték a tanulmány során, mivel a G2 a leggyakoribb tumorfokozat ebben a tervezett felhasználási betegpopulációban.

Ezeket a kovariánsokat klinikai kezelési pontszám (CTS) formájában írják be a modellbe. A CTS meghatározásához az alábbi modellt alkalmazták:

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

Ahol a „z” a fenti listában szereplő klinikai és kezelési változóknak felel meg, és a CTS definiálásához a fent kiszámított γ érték becslését használták fel, vagyis:

$$CTS = \sum_j z_j \gamma_j$$

Az arányos kárárd feltételezését a Schoenfeld maradványértékek használatával tesztelték.

Az ellenőrző tanulmányban szereplő betegek jellemzői hasonlóak voltak az eredeti ACBSG-8 tanulmányban szereplőkével.

30. táblázat: A klinikai jellemzők összesítése

Jellemzők	Érték	Szerepelt (n = 1478)		Nem szerepelt (n = 2236)		Összesen (n = 3714)	
		Szám	%	Szám	%	Szám	%
Kezelés	Csak tamoxifen	741	50,1%	1108	49,3%	1849	49,8%
	Tamoxifen → Anasztrozol	737	49,9%	1128	50,2%	1865	50,2%
ER-állapot	Negatív	14	0,9%	32	1,4%	46	1,2%
	Pozitív	1464	99,1%	2199	98,3%	3663	98,6%
	Ismeretlen	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Fokozat	G1	271	18,3%	468	20,8%	739	19,9%
	G2	1152	77,9%	1659	73,9%	2811	75,7%
	GX	55	3,7%	109	4,9%	164	4,4%
Csomóállapot	N0	1047	70,8%	1723	76,7%	2770	74,6%
	N+(1-3)	382	25,8%	449	20,0%	831	22,4%
	N+(≥ 4)*	49	3,3%	64	2,8%	113	3,0%
PgR-állapot	Negatív	260	17,6%	424	18,9%	684	18,4%
	Pozitív	1218	82,4%	1805	80,4%	3023	81,4%
	Ismeretlen	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
Tumor stádiuma	T1	1037	70,2%	1745	77,7%	2782	74,9%
	T2	427	28,9%	472	21,0%	899	24,2%
	T3	14	0,9%	19	0,8%	33	0,9%
Kor	Medián	63		-		64	
	Tartomány	41-79				41-80	

* > 9 pozitív csomóval rendelkező beteget tartalmaz

31. táblázat: További klinikai jellemzők

Jellemzők	Érték	Betegek száma	Betegek százalékos értéke
NanoString intrinzik altípus	Luminális A	1004	67,9%
	Luminális B	418	28,3%
	HER2-dúsított	48	3,2%
	Bazális szerű	8	0,5%
Kiújulások	Távoli	155	10,5%
	Bármely	194	13,1%
HER2-állapot	Negatív	1397	94,5%
	Pozitív	77	5,2%
	Ismeretlen	4	0,3%

Eredmények

A teszteléshez rendelkezésre álló 1620 szövetből 25 (1,5%) nem felelt meg a megfelelő tumor előre definiált patológiai ismérveinek, az 1595 életképes invazív szövetet tartalmazó szövetmintából 73 (4,6%) nem felelt meg a kivonatolt RNS előre definiált minőség-ellenőrzési specifikációjának és az 1522 RNS-mintából 44 (2,9%) nem felelt meg a teszt minőség-ellenőrzési specifikációjának a Prosigna eredményéhez, így összesen 1478 (91,2%) minta maradt elemzésre.

Az elemzésre rendelkezésre álló 1478 beteg közül 155-nél távoli kiújulás, 194-nél pedig helyi vagy távoli kiújulás vagy halál következett be az emlőrák következményeként. A vizsgálat medián követési időszaka 10 év volt.

Az elsődleges elemzés tesztelése kimutatta, hogy az ROR-pontszám további szignifikáns prognosztikus információt nyújt a távoli kiújulástól mentes túléléshez a szabványos klinikai változókon túl (CTS).

32. táblázat: Az elsődleges elemzés tesztelésének összesítése

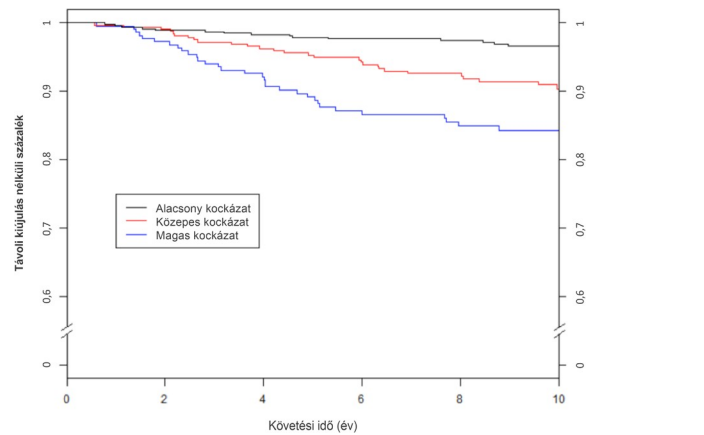
Null modell	Alternatív modell	ΔLR χ²	χ² Kritikus érték (szabadságfokok)	χ² p-érték
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Kockázati csoport	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

A másodlagos elemzés kimutatta, hogy az ROR szignifikáns összefüggésben áll a távoli kiújulástól mentes túléléssel, és a CTS-en túli prognosztikus információt nyújt több klinikailag releváns alcsoport esetében.

33. táblázat: Az elsődleges elemzési teszt megismétlése előre definiált alcsoportokra

Tárgycsoport	Betegek száma	Események száma	CTS+ROR / CTS	CTS+Kockázati csoport / CTS
			ΔLR χ² (Krit. érték= 3,84)	ΔLR χ² (Krit. érték = 5,99)
Mind	1478	155	53,49	34,12
HER2-negatív	1397	145	47,50	29,94
N0	1047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negatív	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negatív	367	56	22,75	18,75

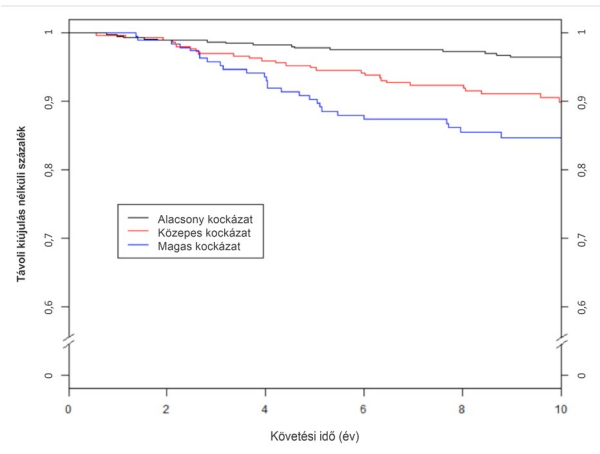
34. ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében



A 34. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	Események 10 éven belüli események	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	487 (47%)	15	96,6% [94,4%-97,9%]
Közepes	335 (32%)	28	90,4% [86,3%-93,3%]
Magas	225 (21%)	32	84,3% [78,4%-88,6%]
Összesen	1047 (100%)	75	

35. ábra: DRFS kockázati csoportonként HER2-negatív, csomó-negatív betegek esetében

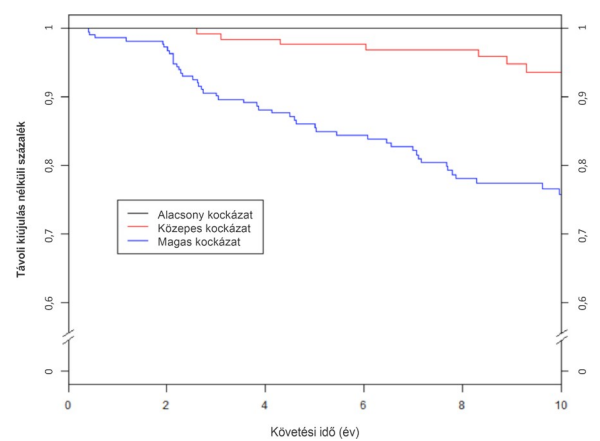


A 35. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként HER2-negatív, csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	474 (48%)	15	96,5% [94,3%-97,9%]
Közepes	311 (32%)	27	90% [85,6%-93,1%]
Magas	199 (20%)	27	84,7% [78,4%-89,3%]
Összesen	984 (100%)	69	

A 36. ábrán a Kaplan-Meier forgatókönyvek láthatók kockázati csoport szerint a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében, a 37. ábrán pedig ugyanazok a forgatókönyvek csomó-pozitív, HER2-negatív betegek (1-3 csomó) esetében. Az eredmények hasonlóak a HER2-pozitív betegekkel és azok nélkül.

36. ábra: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében

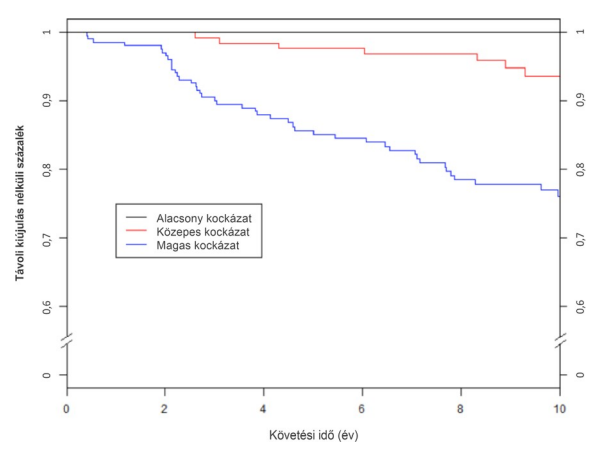


A 36. ábra adatainak összesítése: DRFS kockázati csoportonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma (%)	Események 10 éven belüli események	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	15 (4%)	0	100% [78,2%-100%]
Közepes	143 (37%)	7	93,6% [86,9%-97%]
Magas	224 (59%)	46	75,8% [68,9%-81,4%]
Összesen	382 (100%)	53	

* Clopper-Pearson-módszerrel becsült konfidenciaintervallum

37. ábra: DRFS kockázati csoportonként HER2-negatív, csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében



A 37. ábra adatainak összesítése – DRFS kockázati csoportonként HER2-negatív, csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében

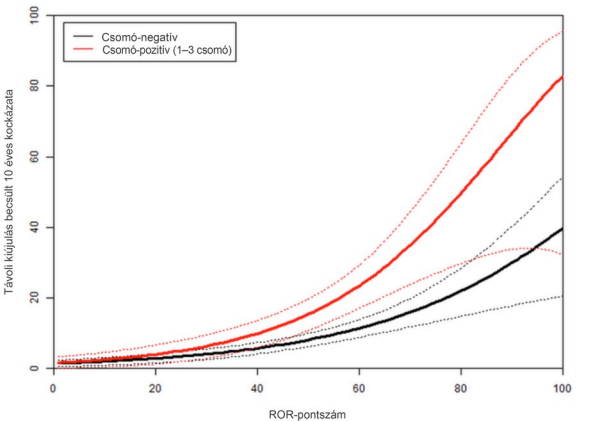
Kockázati csoport	Betegek száma (%)	Események 10 éven belüli események	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Alacsony	15 (4%)	0	100% [78,2%-100%]
Közepes	142 (39%)	7	93,6% [86,8%-96,9%]
Magas	210 (57%)	43	76,1% [69,0%-81,8%]
Összesen	367 (100%)	50	

* Clopper-Pearson-módszerrel becsült konfidenciaintervallum

Az ROR és a kockázat előrejelzése közötti összefüggés

A 38. ábrán a DR 10 éves kockázata látható az ROR-pontszám függvényében 95%-os konfidenciaintervallumokkal a különálló arányos veszélyességi Cox-modell alapján, az összes csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 pozitív csomó) betegcsoportra vonatkozóan. A csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében az arányos házár feltételezését megsértették a teljes tartományra alkalmazáskor. A csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek itt látható görbéje az ROR-pontszámmal rendelkező csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek adatait használja fel a 0-80 tartományban, amelyre vonatkozóan az arányos házár feltételezése helytálló volt.

38. ábra: Tíz éves becsült DR-kockázat csomókategóriánként 95%-os konfidenciaintervallumokkal



Az alacsony kockázati kategóriába sorolt betegek abszolút klinikai kockázata minden alcsoportban lényegesen eltért a magas kockázati kategóriába sorolt betegek abszolút klinikai kockázatától.

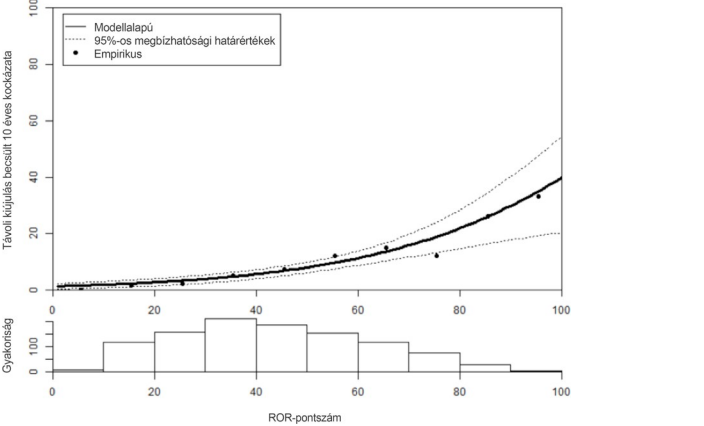
A 34. táblázatban a csomó-negatív betegek megoszlása látható 10 ROR egységenként. Szintén látható a 10 éves DR-kockázat.

34. táblázat: A csomó-negatív betegek megoszlása 10 ROR egységes tartományokban

ROR-tartomány	Betegek száma	Betegek százalékos értéke	10 éves DR-kockázat (empirikus)
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%
Összesen	1 047	100%	

A 39. ábrán a csomó-negatív betegek modellalapú görbéje látható az empirikusan becsült 10 éves túlélési aránnyal a 10 ROR egységenként, ahol minden sor a 10 egységes ROR-tartomány (1-10, 11-20 stb.) összes betegét tartalmazza. A görbe alatt egy hisztogram mutatja a gyakoriság megoszlását tartományonként.

39. ábra: A csomó-negatív betegek tíz éves DR-kockázata modellalapú és az empirikus becslésének összehasonlítása, alatta az ROR-pontszámok megoszlása



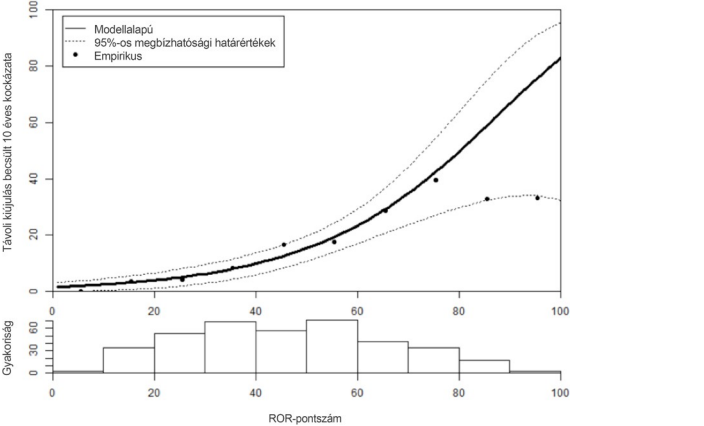
A csomó-negatív betegek esetében az arányos hazárd modellalapú becslése hasonló volt az empirikus becsléshez a teljes tartományban. A 35. táblázatban a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek megoszlása látható 10 ROR egységenként. Szintén látható a 10 éves DR-kockázat.

35. táblázat: A csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek megoszlása 10 ROR egységes tartományokban

ROR-tartomány	Betegek száma	Betegek százalékos értéke	10 éves DR-kockázat (empirikus)
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%
Összesen	382	100%	

A 40. ábrán a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek modellalapú görbéje (a ≤ 80 ROR-pontszámmal rendelkező csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek vonatkozóan) látható az empirikusan becsült 10 éves túlélési aránnyal a 10 ROR egységenként, ahol minden sor a 10 egységes ROR-tartomány (1-10, 11-20 stb.) összes betegét tartalmazza. A görbe alatt egy hisztogram mutatja a gyakoriság megoszlását tartományonként.

40. ábra: A csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek tíz éves DR-kockázata modellalapú és az empirikus becslésének összehasonlítása, alatta az ROR-pontszámok megoszlása



A 35. táblázat és a 40. ábra egyaránt a megfigyelt 10 éves kockázati értékek lapulását mutatja az ROR-tartomány tetején, amely az arányos hazárd feltételezés sikertelenségéhez vezetett. Meg kell említeni azonban, hogy a 80 érték feletti két tartomány mintamérete kicsi volt a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében (17 beteg a 81-90 tartományból és csak 3 a 91-100 tartományból).

A luminális A és a luminális B intrinzik altípus összehasonlítása

A tanulmányban szereplő alanyok nagy része (96%) a luminális A vagy a luminális B alcsoportba tartozott, amely nem várt érték volt, mert ezek az intrinzik altípusok hormonreceptor-pozitív betegek esetében vannak túlsúlyban¹².

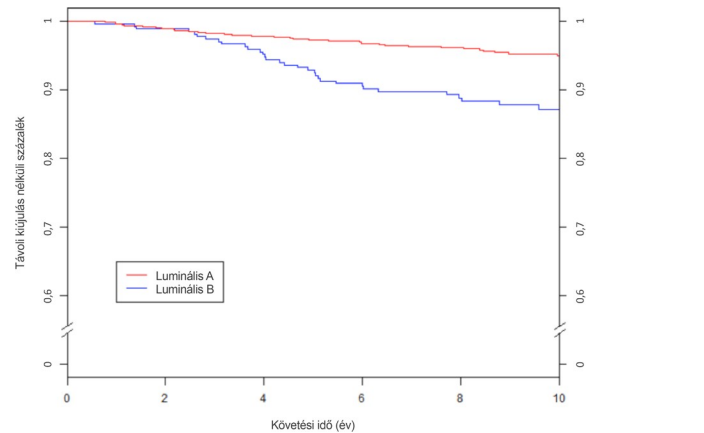
A 36. táblázatban a valószínűségirány-tesztek eredményei láthatók a DRFS további prognosztikus értékeinek megjelenítéséhez, amelyeket a luminális A/luminális B megkülönböztetés ad a CTS-hez. A táblázatban továbbá a luminális A és a luminális B betegek kockázati arányának összehasonlítása is látható. A luminális A betegek esetében a távoli kiújulás kockázata szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom csoportban.

36. táblázat: A luminális altípusok DRFS prognosztikus értékeinek valószínűségirány-tesztje

Alcsoport	száma Betegek	száma Események	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-érték	A LumA kockázati aránya: LumB (95% CI)
Mind	1422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30-0,59]
N0	1009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30-0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19-0,58]

A 41. ábrán a DRFS luminális alcsoportonkénti összehasonlítása látható a csomó-negatív betegek esetében, a 42. ábrán pedig ugyanez az összehasonlítás a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében. Mindkét csoport esetében jelentős eltérések voltak a luminális A és a luminális B betegek DRFS-eközött.

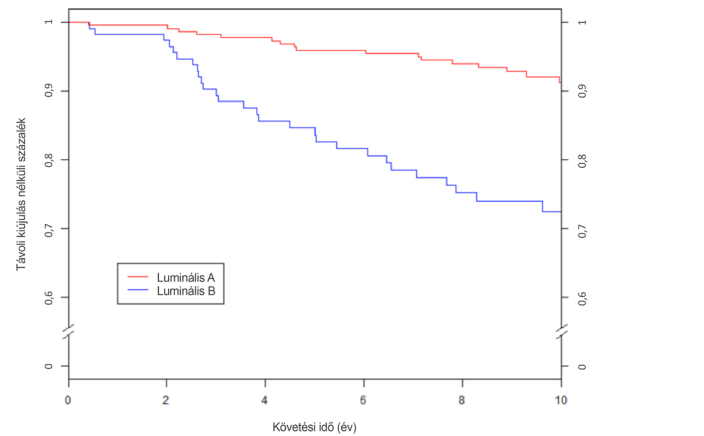
41. ábra: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-negatív betegek esetében



A 41. ábra adatainak összesítése: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-negatív betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma	Események 10 éven belüli	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Luminális A	725	32	95,1% [93,4%-96,3%]
Luminális B	284	32	87,2% [83,2%-90,3%]
Összesen	1009	64	

42. ábra: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében



A 42. ábra adatainak összesítése: Kaplan-Meier görbék DRFS-hez intrinzik altípusonként csomó-pozitív (1-3 csomó) betegek esetében

Kockázati csoport	Betegek száma	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
Luminális A	248	17	91,3% [87,2%-94,2%]
Luminális B	118	28	72,5% [64,2%-79,1%]
Összesen	366	45	

A 37. táblázatban a 10 éves RFS-arányok láthatók luminális altípusonként a csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 csomó) csoportokra vonatkozóan.

37. táblázat: Tíz éves RFS-arány csomócsoportonként és luminális altípusonként

Csomóállapot	Luminális altípus	Betegek száma (%)	10 éven belüli események száma	Becsült százalékos érték távoli kiújulás nélkül 10 évre [95% CI]
N0	Luminális A	725 (72)	44	93,0% [91,1%-94,5%]
	Luminális B	284 (28)	44	82,2% [77,6%-85,9%]
N+(1-3)	Luminális A	248 (68)	21	89,1% [84,7%-92,4%]
	Luminális B	118 (32)	30	71,6% [62,2%-77,4%]

Minden csomó-negatív és csomó-pozitív (1-3 csomó) betegpopuláció esetében szignifikáns volt a luminális A és a luminális B betegek közötti eltérés.

Az 2. klinikai tanulmány következtetése

Az ROR-pontszám szignifikáns prognosztikus információt adott hozzá a szabványos klinikai és kezelési változókon túl, amikor azt folyamatos mérőszámként és három előre definiált kockázati csoporttal alkalmazták. Az alacsony kockázatú csoport 10 éves DRFS-e jóval 90% feletti volt, a várakozásoknak megfelelően. A magas kockázatú csoport 10 éves DRFS-e 80% volt, ami magasabb a vártnál (80% alatti érték volt a várt). A kockázati csoportok definiálásához használt határértékek (cutoff) a TransATAC kohorszán alapultak, ami az aktuális kohorsznál nagyobb kockázatot jelent, ennek eredményeként a „magas kockázatú csoport” kockázata általánosan alacsonyabb a vártnál. Az ROR (folyamatos és kockázati csoporton alapuló) hasonló prognosztikus információt mutatott a különböző alcsoportokban. A folyamatos kockázati modell a csomó-negatív és a csomó-pozitív (1-3 csomó) betegpopuláció esetében is az empirikus kiújulási aránnyal közel azonos értéket adott. A tanulmányban szereplő betegek legtöbbször (96%) két luminális altípus (luminális A és luminális B) egyikebe tartozott. A luminális A/luminális B megkülönböztetés minden csomóállapot-csoportban prognosztikus információt adott a DRFS-hez.

Kombinált klinikai tanulmányok összesítése

Az eredmények általánosíthatók elosztott használatra, mivel a két klinikai ellenőrző tanulmányban szereplő mintákat elküldték elemzésre két különböző laboratóriumnak. Az ROR-pontszám szignifikáns prognosztikus információt adott hozzá a 10 éves DRFS-hez szabványos klinikai és kezelési változókon túl, amikor azt folyamatos mérőszámként és három előre definiált kockázati csoporttal alkalmazták. Az ROR a post-hoc elemzés során továbbá szignifikáns információt adott hozzá az 5 éves túli DRFS-hez a szabványos klinikai változókon túl, minden beteg esetében. Az ROR (folyamatos és kockázati csoporton alapuló) hasonló prognosztikus információt mutatott a különböző alcsoportokban. Korlátozott számú elemzést végeztek el az RFS használatával is. Az ROR-osztályok segítségével továbbá három, eltérő RFS-értékű kockázati csoport definiáltak. Mindkét tanulmány esetében jelentős eltérés volt a luminális A és a luminális B alcsoport DRFS-e között a csomóállapottól függetlenül.

17 BIBLIOGRÁFIA

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs (Génexpresszió közvetlen multiplex mérése színekódolt szondapárokkal). Nature Biotechnology 2008.; 26:317-25.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes (Emlőrák felügyelt kockázat-előrejelzése intrinzik altípusok alapján). Journal of Clinical Oncology, 2009., 27(8): 1160-1167.
- Dowsett M. et al. az ATAC és a LATTE vizsgálócsoport nevében. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy (A PAM50 kiújulási kockázati pontszám összehasonlítása az Oncotype DX és az IHC4 teszttel a távoli kiújulás kockázatának előre jelzése céljából endokrin terápiát követően). Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013. augusztus 1.;31(22):2783-90.
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer (A PAM50 intrinzik altípusba sorolásának összehasonlítása immunhisztokémiás és a klinikai prognosztikus faktorokkal tamoxifennel kezelt ösztrogénreceptor-pozitív emlőrák esetében). Clinical Cancer Research, 2010.; 16: 5222-5232.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast (Az emlő megbetegedései), 4. kiadás. 2009.: 458-471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report (A külső RNS-szabályozó konzorcium: helyzetjelentés). Nature Methods, 2010.; 2: 731-734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline (A kvantitatív mérési módszerek precíziós teljesítményének kiértékelése; jóváhagyott iránymutatások) - második kiadás. Clinical Laboratory Standards Institute. 24. kötet.
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score (Kései távoli kiújulás előrejelzése 5 éves endokrin kezelést követően: az ausztriai 8-as emlő- és vastagbélrák tanulmányi csoportba tartozó betegek és az arimidex és a tamoxifen külön-külön és kombinálva, randomizált vizsgálatok során, PAM50 kiújulási kockázati pontszám használatával történő alkalmazásának kombinált elemzése). Journal of Clinical Oncology; 2014.; okt. 20., ePub, nyomtatás előtt, JCO.2014.55.6894.
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial (Az anasztrozol és a tamoxifen hatása korai stádiumú emlőrák adjuváns kezeléseként: az ATAC vizsgálat 10 éves elemzése). Lancet Oncology, 2010.; 11(12):1135-41.
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (Tamoxifen és anasztrozol mint szekvenálási stratégia: randomizált, ellenőrzött vizsgálat menopauza utáni, endokrin reszponzív, korai emlőráktól szenvedő, az ausztriai emlő- és vastagbélrák tanulmányi csoportba tartozó betegeken). Journal of Clinical Oncology, 2012.;30(7): 722-728.
- Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study (A távoli kiújulás kockázatának előrejelzése a 21 génes kiújulási pontszám használatával csomó-negatív és csomó-pozitív, menopauza utáni betegek esetében, akiknek emlőrákját anasztrozollal vagy tamoxifennel kezelték: a TransATAC tanulmánya). Journal of Clinical Oncology, 2010.; 28:1829-1834.

12. Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer (Az ösztrogénreceptor, a progeszteron receptor, a Ki-67 és az emberi epidermális növekedési faktor receptor 2 immunhisztokémiás pontszámának prognosztikus értéke és annak összehasonlítása a Genomic Health® kiújulási pontszámával korai stádiumú emlőrák esetében). *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 (Menopauza utáni, endokrin rezponzív, korai emlőrákban szenvedő nők kezelésének váltása anasztrozolra 2 éves adjuváns tamoxifen kezelés után: a 8-as ABCSG vizsgálat és az ARNO 95 vizsgálat kombinált eredményei). *Lancet*, 2005.; 366(9484): 455-462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis (Az adjuváns tamoxifen kezelésről anasztrozolra váltás hatékonysága menopauza utáni, hormonérzékeny, korai stádiumú emlőrákban szenvedő nők esetében: metaelemzés). *Lancet Oncology*, 2006.; 7(12): 991-996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone (Receptorpozitív, emlőrákos betegek távoli kiújulásának előrejelzése korlátozott klinikopatológiai kockázatokkal: a PAM50 kiújulási kockázati pontszám használata 1478 menopauza utáni, az ABCSG-8 vizsgálatban részt vett, csak adjuváns endokrin terápiát kapott beteg esetében). *Annals of Oncology*, 2014.; 25(2):339-45.

19 ELÉRHETŐSÉGEK

 Egyesült államokbeli elérhetőségek:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com

EC REP

EU-beli meghatalmazott képviselő:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Globális elérhetőségek:
Technikai támogatás e-mail-címe: DxSupport@Veracyte.com
Termékinformációs e-mail-cím: info@prosigna.com
Webhely: www.prosigna.com

18 SZIMBÓLUMOK ÉS MEGHATÁROZÁSOK

 - Gyártó

 - Hivatalos képviselő az Európai Közösségben

 - *In vitro* diagnosztikai orvostechnikai eszköz

 - Olvassa el a használati útmutatót

 - CE-jelölés

 - Tételkód / Tételszám

 - Katalógus- vagy referenciaszám

 - Elegendő anyagot tartalmaz <n> teszthez

 - Hőmérséklet-tartomány a tároláshoz

 - Tárolási hőmérséklet-tartomány alsó határértéke

 - Tárolási hőmérséklet-tartomány felső határértéke

 - Szavatosság / Lejárat dátuma

 - Ezzel az oldalával felfelé

Room Temp. = Room Temperature (Szobahőmérséklet)

HYB = Hybridization (Hibridizáció)

Szabályozási záradék

Kizárólag *in vitro* diagnosztikai használatra.

© 2023 Veracyte, Inc. és leányvállalatai. Minden jog fenntartva.
A Veracyte, a Veracyte logó, a Prosigna és a Prosigna logó a Veracyte, Inc. és leányvállalatai védjegyei. Az nCounter a Nanostring Technologies, Inc. védjegye, és használata engedéllyel történik.