

Ulotka dołączona do opakowania
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay


Wersja 01, utworzona 2023-07



1-10 testów

Warunki przechowywania

-20°C Przechowywać w temperaturze -20°C lub niższej	Cartridge Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test
-80°C Przechowywać w temperaturze -80°C lub niższej	Zestaw CodeSet do Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test
+25°C Przechowywać w temperaturze pokojowej	Zestaw materiałów Prep Pack do Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test
+2°C Przechowywać w temperaturze +4°C	Płytki Prep Pack do oznaczenia prognostycznej sygnatury genowej raka sutka Prosigna

SPIS TREŚCI

1	PRZEZNACZENIE/CEL	1
2	PODSUMOWANIE SYSTEMU TESTU	1
2.1	Zasada działania systemu analizy nCounter	2
2.2	Zasada działania algorytmu obliczania wyniku systemu Prosigna	2
3	DOSTARCZANE ODCZYNNIKI I WYPOSAŻENIE	2
3.1	Charakterystyka zestawu Prosigna	2
3.2	Prosigna Kit Contents for a 1, 2, 3, 4, or 10 test Prosigna Kit	3
4	OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI	3
5	OGÓLNE UWAGI DOTYCZĄCE STOSOWANIA	3
5.1	Przetwarzanie tkanki	3
5.2	Wykonanie oznaczenia Prosigna	4
6	INFORMACJE DOTYCZĄCE SZKOLEN	4
7	POSTĘPOWANIE Z ODPADAMI	4
8	PRZECZYSZCZANIE I SPOSÓB POSTĘPOWANIA (ODCZYNNIKI)	4
9	URZĄDZENIA WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA PROSIGNA	4
10	ODCZYNNIKI I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, LECZ NIE DOSTARCZANE	4
10.1	MATERIAŁY	4
10.2	Wyposażenie	4
10.3	Specyfikacja wyposażenia	4
11	POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU	5
11.1	Wymogi dotyczące materiału tkankowego i przeglądu patologicznego	5
11.2	Pobieranie i przechowywanie materiału	5
11.3	Przygotowanie preparatu	5
11.4	Przetwarzanie preparatu	5
11.5	Izolacja RNA	6
11.6	Pomiar stężenia i jakości RNA	6
11.7	Procedura wykonania oznaczenia	7
12	ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW I NIEPOWODZENIA TESTÓW	9
13	WYNIKI OZNACZENIA	9
13.1	Podtypy	9
13.2	Wynik ROR	10
13.3	Prawdopodobieństwo odległego nawrotu choroby po 10 latach	10
13.4	Klasyfikacja ryzyka	10
13.5	Kontrola jakości	10
14	OGRA NICZENIA PROCEDUR	10

15	WARTOŚCI OCZEKIWANE	11
15.1	Zakres ROR w zależności od podtypu	11
15.2	Częstotliwość wyniku ROR względem stanu węzłów	11
15.3	Przeżywalność bez nawrotów względem kategorii ryzyka	11
16	CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI	12
16.1	Precyzja analityczna i powtarzalność	12
16.2	Czułość/wejściowe RNA	13
16.3	Badania zaburzeń	13
16.4	Wydajność kliniczna	14
17	LITERATURA	25
18	SYMBOL E I DEFINICJE	26
19	DANE KONTAKTOWE	26

1 PRZEZNACZENIE/CEL

Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test jest oznaczeniem diagnostycznym *in vitro* wykorzystującym profil ekspresji genów komórek występujących w tkance raka sutka do oceny ryzyka odległego nawrotu choroby u pacjentki. Oznaczenie mierzy profil ekspresji genów za pomocą RNA wyekstrahowanego z utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) tkanki raka piersi. Dane ekspresji genów ważne są ze zmiennymi klinicznymi do wygenerowania podtypu (luminalny A, luminalny B, z nadekspresją HER2 basał podstawny) oraz stopnia w skali wskazującej na prawdopodobieństwo odległego nawrotu choroby. Oznaczenie wykonywane jest w systemie analizy nCounter® z użyciem tkanki raka piersi FFPE rozpoznanej wcześniej jako inwazyjny rak piersi.

Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test jest wskazane u pacjentek, które przeszły zabieg mastektomii lub leczenie oszczędzające pierś w połączeniu z leczeniem miejscowym zgodnym ze standardem opieki, jako:

- Wskaźnik prognostyczny 10-letniej przeżywalności bez nawrotów u kobiet po menopauzie z rakiem piersi wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych (HR+), bez zajętych węzłów chłonnych, stopnia I lub II przeznaczonym do leczenia wyłącznie wspomagającą terapią hormonalną przy zastosowaniu wraz z innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.
- Wskaźnik prognostyczny 10-letniej przeżywalności bez odległych nawrotów u kobiet po menopauzie z rakiem piersi wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych (HR+), z przerzutami do węzłów chłonnych (1-3 zajęte węzły lub 4 lub więcej zajętych węzłów chłonnych), stopnia II lub IIIA przeznaczonym do leczenia wyłącznie wspomagającą terapią hormonalną przy zastosowaniu wraz z innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.

2 PODSUMOWANIE SYSTEMU TESTU

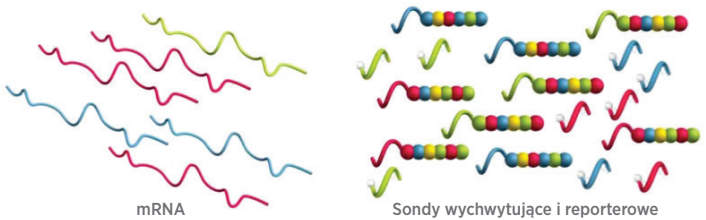
System analizy nCounter dostarcza bezpośrednich, wielokanałowych pomiarów ekspresji genów dzięki cyfrowym odczytom względnej liczebności transkryptów mRNA dzięki następującym krokom: 1) hybrydyzacja RNA z fluorescencyjnymi sondami reporterowymi Reporter Probe i sondami wychytującymi Capture Probe, 2) oczyszczenie kompleksów cel/sonda za pomocą płytek nCounter Prep Plates, zawierających odczynniki konieczne do przetworzenia po hybrydyzacji oraz immobilizacji na kasecie nCounter w urządzeniu nCounter Prep Station oraz 3) analizie kasety nCounter w analizatorze cyfrowym nCounter do uzyskania wyniku testu. Sondy wychytujące (Capture Probes) i reporterowe (Reporter Probes) zawierają unikalne sekwencje DNA do hybrydyzacji i oczyszczenia sekwencji docelowych. Sondy wychytujące i reporterowe połączone są z kontrolami dodatnimi i ujemnymi w zestaw CodeSet. oznaczenie Prosigna mierzy równocześnie poziom ekspresji 50 genów używanych w wewnętrznym algorytmie klasyfikacji podtypów², 8 genów „porządkowych” wykorzystywanych do normalizacji sygnału, 6 kontroli dodatnich i 8 kontroli ujemnych w jednej reakcji hybrydyzacji z użyciem sond z kwasów nukleinowych zaprojektowanych swoiście do tych genów. Zestaw Prosigna zawiera także Próbkę Referencyjną zawierającą transkrybowane *in vitro* RNA docelowe dla każdego z 58 genów. Próbkę Referencyjną jest testowana z każdą partią próbek RNA pacjentek w celu zakwalifikowania barwienia i znormalizowania sygnału każdego z genów.

Oznaczenie Prosigna jest wykonywane na RNA wyizolowanym z utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie (FFPE) tkanki raka piersi. Patolog bada preparat wybarwiony hematoxyliną i eozyną (H+E), na którym identyfikuje i oznacza obszar inwazyjnego raka piersi nadający się do testu. Patolog mierzy także powierzchnię guza, co determinuje liczbę niewybarwionych preparatów wymaganych do testu oraz budowę histologiczną guza w celu zapewnienia dostatecznej ilości tkanki nowotworowej do testu. Przeszkolony technik dokonuje na niewybarwionych preparatach rozcięcia obszaru odpowiadającego rejonowi guza oznaczonemu na preparatach wybarwionych H+E i dokonuje izolacji RNA z tkanki. Wyizolowane RNA jest następnie badane w systemie analizy nCounter w celu uzyskania wyników testu, włącznie z wewnętrznym podtypem, stopnia ryzyka nawrotu (Risk of Recurrence, ROR) i kategorią ryzyka.

2.1 Zasada działania systemu analizy nCounter

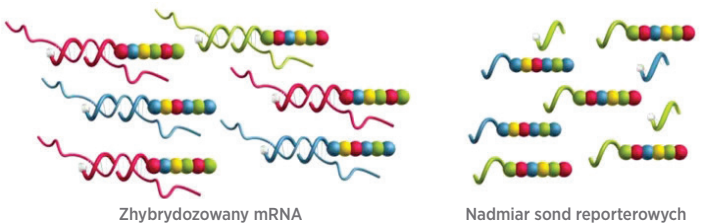
System analizy nCounter wykorzystuje swoiste dla genów pary sond (rysunek 1), które hybrydują bezpośrednio z mRNA próbki w roztworze, eliminując reakcje enzymatyczne, które mogłyby wprowadzić do wyników błąd systematyczny. W pierwszym kroku oznaczenia sondy DNA hybrydują bezpośrednio z rejonem 70-100 par zasad RNA w roztworze. Fluorescencyjna sonda reporterowa Reporter Probe składa się z sekwencji sondy długości 35-50 pz komplementarnej do docelowego mRNA oraz unikalnej podstawowej sekwencji DNA hybrydującej z sześcioma segmentami RNA, które zostały oznaczone jednym z czterech barwników fluorescencyjnych: czerwonym (red, R), żółtym (yellow, Y), niebieskim (blue, B) lub zielonym (green, G). Segmenty fluorescencyjne tworzą sześciopozycyjny/ czterokolorowy fluorescencyjny „kod barwny” unikalny dla każdej sekwencji docelowej. Osobna sonda wychytująca Capture Probe składa się z podstawowej sekwencji sondy długości 35-50 pz komplementarnej do docelowej sekwencji RNA i biotyny, używanej do immobilizacji na preparacie pokrytym streptawidyną.

Rysunek 1: Hybrydyzacja odczynników zestawu CodeSet z mRNA

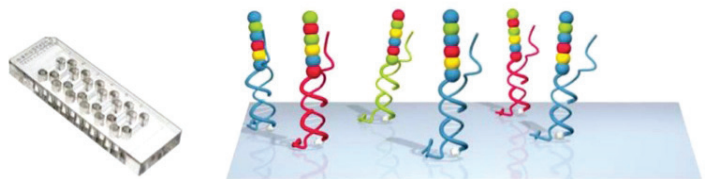


Po hybrydyzacji wszystkie kroki oczyszczania próbki są wykonywane automatycznie w urządzeniu nCounter Prep Station. Najpierw usuwany jest nadmiar sond wychytujących i reporterowych (rysunek 2) za pomocą kolejnych kroków wychwytywania koralików magnetycznych, po czym następuje wiązanie kompleksów sonda-cel do losowych lokalizacji na powierzchni kasety nCounter dzięki wiązaniu streptawidyna-biotyna (rysunek 3). Na koniec kompleksy sonda/cel zostają wyrównane i immobilizowane w kasecie nCounter (rysunek 4).

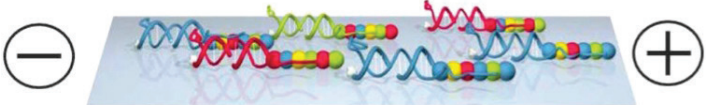
Rysunek 2: Usunięcie nadmiaru sond reporterowych



Rysunek 3: Wiązanie zhybrydowanych sond reporterowych do powierzchni kasety



Rysunek 4: Wyrównanie i immobilizacja zhybrydowanych sond reporterowych



Po zakończeniu przetwarzania próbki Kasetę umieszcza się w analizatorze cyfrowym nCounter do odczytu danych. Każda cząsteczka docelowa jest identyfikowana na podstawie kodu barwnego generowanego przez sześć, ustawionych w określonej kolejności prążków fluorescencyjnych na związanej sondzie reporterowej. Sondy reporterowe na powierzchni kasety zostają zliczone i wyszczególnione dla każdej cząsteczki docelowej, a wynik zostaje przetworzony za pomocą algorytmu (rysunek 5).

Rysunek 5: Zbieranie danych

Kod	Gen	Liczba
●●●●●●	x	3
●●●●●●	y	1
●●●●●●	z	2

2.2 Zasada działania algorytmu obliczania wyniku systemu Prosigna

Test wykorzystuje algorytm klasyfikacji 50 genów, nazwany początkowo PAM50², wykonywany w systemie analizy nCounter z użyciem RNA wyekstrahowanego z utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (FFPE) próbek tkanki raka piersi. Algorytm wykorzystuje profil ekspresji 50 genów do przydzielenia raka piersi do jednej z czterech klas molekularnych lub podtypów wewnętrznych: luminalny A, luminalny B, z nadekspresją HER2 lub basal². Prototypowe profile ekspresji genów (np. środkowy) czterech podtypów wewnętrznych uzyskano w systemie analizy nCounter za pomocą próbek FFPE raka piersi zebranych z wielu ośrodków klinicznych w Ameryce Północnej. Po wykonaniu oznaczenia na próbce pacjenta algorytm obliczeniowy wykorzystujący korelację Pearsona porównuje znormalizowany profil ekspresji 50 genów w próbce pacjenta z wzorcowymi profilami ekspresji czterech podtypów wewnętrznych raka piersi. Próbkę pacjenta przydziela się podtyp o najwyższym współczynniku korelacji Pearsona.

Algorytm zgłasza wynik stopnia ryzyka nawrotu (Risk of Recurrence, ROR) w skali 0-100³, który koreluje z prawdopodobieństwem odległego przerzutu po dziesięciu latach u kobiet po menopauzie z rakiem piersi wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium⁴. Raport podaje również kategorię ryzyka (niskie, średnie lub wysokie). Wynik ROR wyliczany jest z użyciem współczynników modelu Cox’a, obejmującego korelację Pearsona podzbioru 46 z 50 genów dla centrów każdego podtypu, wyniku proliferacji i wielkości guza. Badane zmienne mnożone są przez odpowiadające im współczynniki modelu Cox’a do uzyskania wyniku, który następnie korygowany jest do skali 0-100 na podstawie współczynników uzyskanych z zestawu szkoleniowego próbek FFPE guza piersi. Kategorie ryzyka również zgłaszane są na podstawie wartości odcięcia dla ROR określonych w weryfikacyjnym badaniu klinicznym.

3 DOSTARCZANE ODCZYNNIKI I WYPOSAŻENIE

3.1 Charakterystyka zestawu Prosigna

Zestaw Prosigna zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do przetworzenia 1, 2, 3, 4, lub 10 próbek pacjentów, w zależności od zamówionego produktu. Informacje dotyczące zamawiania, patrz niżej. Zestaw Prosigna zawiera zestaw CodeSet, jedną probówkę materiału referencyjnego na każdy zestaw od jednego do dziesięciu testów oraz materiały eksploatacyjne, które zostały przetestowane wspólnie przed wypuszczeniem.

Numer katalogowy	Liczba testów w zestawie	Liczba dołączonych próbek referencyjnych
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Zaleca się stosowanie z zestawem do izolacji RNA Roche FFPET RNA Isolation Kit (Roche-FFPET-025) lub zestawem do ekstrakcji RNA Veracyte FFPE RNA Extraction Kit (550100). Oba zestawy do ekstrakcji RNA są dostępne jedynie w firmie Veracyte.

3.2 Prosigna Kit Contents for a 1, 2, 3, 4, or 10 test
Prosigna Kit

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

Contents Description

Prosigna CodeSet

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

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

Prosigna Prep Plates

Prep Plates

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

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)

sample cartridge(s)

Prosigna Prep Pack

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

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

4 OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Oznaczenie jest przeznaczone do wykonywania przez operatorów przeszkolonych w złożonych technikach biologii molekularnej, zgodnie z miejscowymi przepisami.
- Nie mieszać elementów zestawów z różnych serii odczynników Prosigna. Działanie można zapewnić wyłącznie dla dostarczanych serii zestawów Prosigna, ponieważ są one w ten sposób kwalifikowane podczas produkcji.
- Pozostałości odczynników nie należy wykorzystywać w Oznaczeniu Prosigna.
- Odrzucić wszystkie reakcje o niewłaściwych czasach lub temperaturach hybrydyzacji.
- Ważne jest zachowanie nieprzerwanego nadzoru transferu próbki (tkanka do RNA i RNA do oznaczenia) w celu zapewnienia, że identyfikator pacjenta powiązany jest z prawidłowym wynikiem testu.
- Nieprzestrzeganie podanych na etykiecie warunków przechowywania odczynników może ujemnie wpłynąć na wydajność oznaczenia.
- Podczas pracy z odczynnikami i materiałami zawsze należy nosić rękawiczki.
- Unikać zanieczyszczenia RNazą, co mogłoby ujemnie wpłynąć na jakość wyników.

- Wszystkie próbki i materiały biologiczne należy traktować jak potencjalne ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych i należy je utylizować z podjęciem odpowiednich środków ostrożności oraz zgodnie z przepisami krajowymi, stanowymi i miejscowymi.
- Nigdy nie pipetować ustami.
- Unikać kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi.
- Stosować najlepsze praktyki laboratorium biologii molekularnej w celu zapobiegania skażeniom krzyżowym badanych próbek lub zanieczyszczeniu ich stężonymi docelowymi kwasami nukleinowymi (syntetycznymi lub powielonymi metodą PCR), co może ujemnie wpłynąć na jakość wyników.
- Po zakończeniu przetwarzania płytki Prosigna Prep Plates i kasety nCounter zawierają bardzo niskie stężenie azydku sodu (< 0,1%), w związku z tym zaleca się stosowanie do utylizacji pojemników plastikowych (nie metalowych). Choć jest to wysoce mało prawdopodobne w przypadku zestawów Prosigna, nagromadzenie azydku sodu na metalowych powierzchniach tworzy ryzyko wybuchu.
- Dodatkowe, dotyczące urządzenia informacje w zakresie utylizacji dostępne są w Podręczniku użytkownika systemu analizy nCounter oraz w podręcznikach serwisowych urządzenia Prep Station i analizatora cyfrowego.
- Informacje karty charakterystyki substancji dla odczynników Reporter CodeSet, Capture ProbeSet, Hybridization Buffer i Prep Plates dostępne są na stronie internetowej www.prosigna.com.
- Wszystkie materiały niebezpieczne należy utylizować zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi utylizacji materiałów niebezpiecznych.
- Wszystkie nieużyte zestawy CodeSet należy wyrzucić.
- Nieprawidłowe wprowadzenie do oprogramowania kategorii wielkości guza pacjentki może negatywnie wpłynąć na wynik ROR i klasyfikację ryzyka (np. przesunięty wynik ROR i/lub błędna klasyfikacja).
- W przypadku niewłaściwego wpisania do oprogramowania stanu węzłów pacjentki możliwe jest nieprawidłowe zgłoszenie wyniku testu (np. nieprawidłowa klasyfikacja ryzyka).
- W oznaczeniu Prosigna nie używać RNA niedostatecznej jakości lub ilości, bądź próbek guza z niedostateczną powierzchnią guza lub budowie komórkowej. Oznaczenie Prosigna może nie móc uzyskać prawidłowego wyniku i zamiast tego zgłosić niepowodzenie oznaczenia.

5 OGÓLNE UWAGI DOTYCZĄCE STOSOWANIA

- Oznaczenie jest przeznaczone do stosowania wyłącznie na materiałach utrwalonej formaliną i zatopionej w parafinie (FFPE) tkanki raka piersi pobranych chirurgicznie, nie jest przeznaczone do stosowania na tkance świeżej, mrożonej lub innej niż rak piersi.
- Do wykonania oznaczenia wymagane są informacje o rozmiarze guza pacjentki oraz stanie węzłów.
- Używać jałowych, jednorazowych końcówek pipet, aby podczas przetwarzania uniknąć zanieczyszczenia odczynników lub próbek drobnoustrojami i nukleazami.
- Wyizolowane próbki RNA, które nie są poddawane aktywnej obróbce przechowywać w łaźni lodowej.
- Do bloków grzejnych wymagane są skalibrowane termometry.
- Nie używać elementów zestawu w przypadku odebrania uszkodzonego zestawu.
- W ramach standardowych procedur laboratoryjnej kontroli jakości zaleca się stworzenie kontroli klinicznych (np. dla kategorii ryzyka) i stosowanie ich przez laboratoria stosujące oznaczenia Prosigna w celu zapewnienia dokładności wyników w czasie.

5.1 Przetwarzanie tkanki

- Jeśli otaczająca guz tkanka prawidłowa/tkanka inna niż nowotworowa nie zostanie prawidłowo usunięta podczas preparowania, może to doprowadzić do niedoszacowania ryzyka podczas przetwarzania tkanki z powodu niższego wyniku ROR zgłoszonego lekarzowi.
- Jeśli podczas izolacji RNA nie zostanie prawidłowo usunięte ludzkie DNA genomowe, może to doprowadzić do wyższego wskaźnika niepowodzeń ze względu na słabszy sygnał oznaczenia lub przeszacowania ryzyka z powodu wyższego wyniku ROR zgłoszonego lekarzowi.
- Wszystkie niewybarwione skrawki tkanki powinny zostać zatopione na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych, aby uniknąć oderwania podczas przetwarzania tkanki.
- W przypadku materiałów wymagających wielu preparatów wszystkie preparaty muszą zostać przetworzone razem.
- Zatopione w preparatach skrawki tkanek mogą ulec degradacji w przypadku przechowywania dłużej niż 9 miesięcy w suchym środowisku.
- Aby uniknąć skażenia, roztwór roboczy 3% glicerolu należy wymieniać co tydzień lub jeśli roztwór zmętnieje.

7. Aby uniknąć pogorszenia jakości próbki zawartość płuczki z D-limonenem należy wymieniać po przetworzeniu 4 zestawów preparatów, a etanol (EtOH) i D-limonen w drugim barwiaczu po przetworzeniu 8 zestawów preparatów.
8. Zachować ostrożność przy obrysowywaniu obszaru nowotworu na niewybarwionym preparacie i usuwaniu tkanki innej niż nowotworowa, aby nie dopuścić do uszkodzenia tkanki nowotworowej.
9. Ostrożnie postępować ze skalpelem podczas preparowania.
10. Do każdej przetwarzanej próbki tkanki należy używać nowego ostrza.
11. W 10% SDS często dochodzi do powstawania osadu w temperaturze pokojowej – w takiej sytuacji odczynnik należy podgrzać do temperatury 37°C, do rozpuszczenia osadu*.
12. Nowe serie/partie zestawów do izolacji RNA należy przetestować względem specyfikacji zestawu do izolacji, aby zakwalifikować nowe serie zestawów do testowania próbek pacjentów (szczegółowe informacje, patrz punkt 11.5).

*Do zestawu do izolacji RNA Roche FFPE RNA Isolation Kit wymagany, ale nie dostarczany jest 10% SDS.

5.2 Wykonanie oznaczenia Prosigna

1. Dopilnować prawidłowego wprowadzenia do oprogramowania kategorycznej wielkości guza pierwotnego.
2. Dopilnować prawidłowego wprowadzenia do oprogramowania stanu węzłów pacjentki.
3. Upewnić się, że blok grzewczy z ogrzewaną pokrywą wymagany do hybrydyzacji spełnia specyfikację i jest rutynowo kalibrowany.
4. Używać wyłącznie materiałów eksploatacyjnych dostarczanych z zestawem Prosigna. Zostały one zaprojektowane specjalnie do pracy z urządzeniem nCounter Prep Station i analizatorem cyfrowym nCounter.
5. Jeśli bufor hybrydyzacyjny był przechowywany w niskiej temperaturze i zaobserwowano osad, należy ogrzać próbki w temperaturze 37°C do rozpuszczenia soli.
6. Elementów oznaczenia nie wolno mieszać energicznie lub mieszać w wirówce, ponieważ może to uszkodzić odczynniki. Mieszanie należy wykonać za pomocą pipety.
7. Nie wierać zestawu sond Reporter CodeSet z przyspieszeniem większym niż 3000 × g przez więcej niż 10 sekund. Nie używać opcji wirowania pulsacyjnego wirówki. Może to spowodować wytrącenie odczynników zestawu CodeSet.
8. Reakcje hybrydyzacji należy utrzymywać w temperaturze 65°C do czasu, aż będą gotowe do przeniesienia do urządzenia Prep Station. Ustawienie bloku grzejącego na zejście do temperatury 4°C lub umieszczenie próbek na lodzie na zakończenie hybrydyzacji może doprowadzić do hybrydyzacji krzyżowej, mogącej ujemnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.
9. Niedoprowadzenie pasków próbek do temperatury 65°C w ciągu 15 minut od dodania zestawu Capture ProbeSet może doprowadzić do hybrydyzacji krzyżowej, mogącej ujemnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.
10. Nierozpoczęcie przetwarzania w urządzeniu Prep Station w ciągu 15 minut od wyjęcia próbek z temperatury 65°C może doprowadzić do hybrydyzacji krzyżowej, mogącej ujemnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.
11. Należy dopilnować szczelnego zamknięcia pokrywek paska próbek przed hybrydyzacją w bloku grzejącym, aby zapobiec parowaniu, które mogłoby ujemnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.

6 INFORMACJE DOTYCZĄCE SZKOLEŃ

Oznaczenie jest przeznaczane do wykonywania przez profesjonalnych operatorów przeszkolonych w złożonych technikach biologii molekularnej, zgodnie z miejscowymi przepisami. W celu uzyskania informacji dotyczących szkoleń w zakresie wykonywania Oznaczenia Prosigna należy skontaktować się z firmą Veracyte.

7 POSTĘPOWANIE Z ODPADAMI

Szczegółowe informacje dotyczące postępowania z odpadami zamieszczono w Podręczniku użytkownika systemu analizy nCounter oraz w instrukcjach odczynników stosowanych w procedurach IVD.

Postępowanie z odpadami oraz szczegół dotyczące odczynników do ekstrakcji RNA, patrz instrukcja obsługi wybranego zestawu do ekstrakcji RNA.

8 PRZECHOWYWANIE I SPOSÓB POSTĘPOWANIA (ODCZYNNIKI)

Data ważności dla wszystkich elementów zestawu oznaczenia znajduje się na etykiecie z kodem kreskowym dostarczonej z opakowaniem CodeSet oraz na zewnętrznych oznakowaniu opakowania dla wszystkich elementów zestawów Prosigna.

- Elementy opakowania Prosigna CodeSet (zestaw Prosigna Reporter CodeSet, zestaw Prosigna Capture ProbeSet i próbka referencyjna Prosigna RNA Reference Sample) muszą być przechowywane w temperaturze -80°C lub niższej.
- Kasety nCounter muszą być przechowywane w temperaturze -20°C lub niższej.
- Płytki nCounter Prep Plates muszą być przechowywane w temperaturze 4°C (2-8°C).
- Elementy zestawu nCounter Prep Pack muszą być przechowywane w temperaturze pokojowej, 15°C-25°C.

9 URZĄDZENIA WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA PROSIGNA

- System analizy nCounter (numer katalogowy NCT-SYST-DX) (zawiera oba instrumenty poniżej)
 - o urządzenie nCounter Prep Station 5s (numer katalogowy NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - o analizator cyfrowy nCounter 5s (numer katalogowy NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Dodatkowe informacje, patrz Podręcznik użytkownika systemu analizy IVD nCounter.

10 ODCZYNNIKI I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, LECZ NIE DOSTARCZANE

10.1 Materiały

1. Zestaw do izolacji RNA z FFPE (w przypadku niekorzystania z zestawu Roche FFPE RNA isolation kit lub zestawu Veracyte FFPE RNA Extraction Kit nabytego w firmie Veracyte, patrz punkt 11.5 odnośnie wymagań dotyczących zestawu do izolacji)
2. Hematoksylina i eozyna (H+E)
3. Dodatnio naładowane szklane szkiełka mikroskopowe
4. Środek czyszczący D-limonen (do zastosowań histologicznych)
5. 100% etanol (bezwodny), klasy czystości ACS (stężenie nie niższe niż 99,5%)
6. Glicerol, do stosowania w biologii molekularnej
7. Woda niezawierająca nukleaz, do stosowania w biologii molekularnej¹⁻²
8. 10% SDS, do stosowania w biologii molekularnej¹
9. 10% izopropanol²
10. Probówka stożkowa 50 ml
11. Żyłki (lub skalpele jednorazowe)
12. Jednorazowe ostrza do mikrotomu
13. Probówki do mikrowirówki, 0,5 ml z zakrętką¹ i 1,5 lub 1,7 ml gładkościenne, wolne od RNazy.
14. Wolne od RNazy końcówki do mikropipet z barierą aerozolu.

¹Materiały wymagane, ale nie dostarczone z zestawem do ekstrakcji RNA Roche FFPE RNA Isolation Kit.

²Materiały wymagane, ale nie dostarczone z zestawem do ekstrakcji RNA Veracyte FFPE RNA Extraction Kit i wymienione również w instrukcji obsługi zestawu Veracyte.

10.2 Wyposażenie

1. Mikrotom
2. Łaźnia wodna (40°C)
3. Ogrzewacz do preparatów (45°C)
4. Statyw do suszenia szkiełek mikroskopowych
5. Mikropipety: 2 µl, 20 µl, 200 µl i 1000 µl
6. Miniatura wirówka z wirnikiem na paski próbek 0,2 ml i standardowym wirnikiem mikrowirówkowym na próbki 1,5/2,0 ml
7. Standardowa mikrowirówka białowa z wirnikiem o stałym kącie mieszającym próbki wirówkowe 1,5 ml
8. Prostokątne barwiacze szklane z pokrywkami (szacunkowe wymiary wewnętrzne 91 × 71 × 60 mm (3,6 × 2,8 × 2,4 cala)), wymagane 3 sztuki
9. Statyw na preparaty (mieszczący do dziesięciu szkiełek 75 × 25 mm (3 × 1 cal))
10. Suchy blok grzejny, stacjonarny*
11. Białe mieszadło wibracyjne do próbek mikrowirówkowych
12. Cylinder miarowy (sugerowana wielkość: 100-250 ml)
13. Igła do preparowania lub pęseta do szkiełka nakrywkowego (zagięta, nie żebrowana)
14. Skalibrowane termometry (obejmujące zakres temperatur od 55°C do 80°C)
15. Spektrofotometr UV-VIS z możliwością pomiaru mikro-objętości (patrz specyfikacja poniżej)
16. Blok grzejny z ogrzewaną pokrywą (patrz specyfikacja poniżej)
17. Wirówka z płytowym adapterem do mikropłytek (patrz specyfikacja poniżej)
18. Barwiacz Coplin

*Sprzęt wymagany do ekstrakcji RNA za pomocą zestawów Roche FFPE RNA Isolation Kit oraz Veracyte FFPE RNA Extraction Kit.

10.3 Specyfikacja wyposażenia

Tabela 1: Pełnozakresowy spektrofotometr UV-VIS z możliwością pomiaru mikro-objętości do pomiaru ilości kwasów nukleinowych

Cechy	Parametry
Zakres objętości próbki	1-2 µl
Droga optyczna	1 mm
Zakres długości fal	260-280 nm
Dokładność lub błąd długości fali	± 1 nm
Rozdzielczość widmowa lub szerokość pasma	Mniejsza lub równa 4 nm
Precyzja pomiaru absorbancji lub losowy błąd fotometru	0,003 (przy drodze optycznej 1 mm)
Limit detekcji	5 ng/µl RNA
Maksymalne stężenie	≥ 1000 ng/µl RNA

Tabela 2: Spektrofotometr fotodiodowy UV-VIS z możliwością pomiaru mikro-objętości do pomiaru ilości kwasów nukleinowych

Cechy	Parametry
Zakres objętości próbki	1-2 µl
Droga optyczna	0,5 mm
Zakres długości fal	260 i 280 nm
Rozdzielczość widmowa	Mniejsza lub równa 8 nm
Dokładność pomiaru absorbancji	3% (przy 1,05 Abs dla 260 nm)
Limit detekcji	4 ng/µl RNA
Maksymalne stężenie	≥ 1000 ng/µl RNA

Tabela 3: Blok grzejny z ogrzewaną pokrywą do hybrydyzacji oznaczenia

Cechy	Parametry
Budowa bloku grzejnego	- Musi mieścić standardowe, oznaczone paski próbek 12 × 0,2 ml dostarczane jako element zestawu nCounter Prep Pack. - Bloki grzejne zaprojektowane do niskich (Low Profile, LP) i wysokich (High Profile, HP) próbek nie są kompatybilne (określane również jako „szybkie” bloki do termocyklera). - Bloki grzejne zaprojektowane do innych typów próbek (np. próbki 0,1 ml, 1,5 ml) nie są kompatybilne. - Bok musi być programowany do utrzymywania temperatury 65°C. - Musi utrzymywać temperaturę z dokładnością ± 1°C przy 65°C.
Budowa pokrywy grzejnej	- Dopuszczalne są pokrywy o stałej lub regulowanej wysokości - Pokrywa musi być programowana do utrzymywania temperatury 70°C.

Tabela 4: Wirówka z uchwytem na mikroplaty do wirowania płytek nCounter Prep Plates

Cechy	Parametry
Prędkość wirowania	Minimum 2000 × g
Wirniki	Wirnik horyzontalny 4 × 750 ml z uchwytami na mikroplaty (lub odpowiednik) mieszczącymi mikroplaty 96-dółkowe w formie SBS.
Tryby	Tryby przyspieszania/hamowania

11 POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

11.1 Wymogi dotyczące materiału tkankowego i przeglądu patologicznego

- Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Test Prosigna powinno być wykonywane na utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (FFPE) materiałach tkanki raka piersi z dodatnimi receptorami hormonalnymi, określonych przez patologa jako należące do jednego z następujących typów inwazyjnego raka piersi:
 - inwazyjny rak przewodowy,
 - inwazyjny rak zrazikowy,
 - inwazyjny rak o cechach przewodowych i zrazikowych („rak typu mieszanego”),
 - rak bez określonego typu histologicznego (no special type, NST) lub nie określony inaczej (not otherwise specified, NOS).
- Patolog powinien wybrać do testu błocek FFPE guza o największej powierzchni żywotnego inwazyjnego raka piersi.
- Test wymaga niewybarwionych skrawków tkanki zatopionych na szkiełkach do przetworzenia oraz odpowiadającego im, wybarwionego H+E preparatu z blocka FFPE guza.
- Zaleca się, by skrawki tkanki do przetworzenia w oznaczeniu zostały wycięte przyległe do skrawka tkanki wyciętego do wybarwienia H+E, w celu zapewnienia, by obszar guza zidentyfikowany na preparacie wybarwionym H+E był reprezentatywny dla obszaru guza na preparatach niewybarwionych.
- Patolog musi obrysować rejon żywotnego inwazyjnego raka piersi na preparacie H+E, wykluczając otaczającą go tkankę nie nowotworową.
- Patolog lub przeszkolony technik laboratoryjny musi oszacować budowę komórkową i pole powierzchni guza w obrysowanym obszarze preparatu wybarwionego H+E.
 - Procent komórek nowotworowych na preparacie wybarwionym H+E musi wynosić ≥ 10%.
 - Powierzchnia guza obrysowanego na preparacie wybarwionym H+E musi wynosić ≥ 4 mm².

*Należy pamiętać, że udział procentowy liczby komórek rakowych dotyczy udziału procentowego żywych komórek rakowych w obrębie zakreślonego obszaru występowania nowotworu.

- Do wykonania testu zaleca się łączną powierzchnię guza większą od 100 mm². Tabela poniżej ilustruje zalecaną liczbę preparatów na podstawie powierzchni guza zmierzonej na preparacie wybarwionym H+E.
- Jeśli procedura przeglądu tkanki wykaże, że błocek guza zawiera niedostateczną powierzchnię guza lub niedostateczną liczbę komórek nowotworowych, można poddać ocenie inny błocek z tego samego guza. Jeśli brak blocków FFPE zawierających dostateczną ilość tkanki nowotworowej, nie należy wykonywać Oznaczenia Prosigna. Należy wziąć pod uwagę, że dla guzów o powierzchni poniżej 20 mm² najprawdopodobniej nie zostaną spełnione wymagania dotyczące ilości wejściowego RNA.

Tabela 5: Zalecana liczba preparatów w zależności od powierzchni guza

Powierzchnia guza zmierzona na preparacie wybarwionym H+E (mm²)	Liczba niewybarwionych preparatów
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Pobieranie i przechowywanie materiału

- Pobieranie próbek i utrwalanie w formalinie, postępowanie i przechowywanie blocku FFPE guza oraz wysyłka preparatów tkanki FFPE zatopionej na szkiełkach mogą się odbywać zgodnie ze standardowymi procedurami laboratorium.
- Skrawki tkanki FFPE zatopione w preparatach muszą być przechowywane zgodnie ze standardowymi procedurami laboratorium. W przypadku przechowywania przez dłuższy czas (> 30 dni) preparaty muszą być przechowywane w osuszonym środowisku muszą zostać przetworzone w ciągu 9 miesięcy, aby zapewnić jakość wyników testu.

11.3 Przygotowanie preparatu

- Za pomocą mikrotomu odciąć skrawek grubości 4-5 µm do barwienia H+E.
- Za pomocą mikrotomu odciąć skrawki grubości 10 µm do wykorzystania w oznaczeniu Prosigna.
- Umieścić skrawki w łaźni wodnej o temperaturze 40°C.
- Nanieść skrawki na dodatnio naładowane szkiełka mikroskopowe.
- Poczekać, aż preparaty wyschną na powietrzu.
- Suszyć preparaty przez noc w temperaturze 45°C.

11.4 Przetwarzanie preparatu

- Przygotuj 3% roztwór roboczy glicerolu przez zmieszanie 1,5 glicerolu z 48,5 ml wody do zastosowań w biologii molekularnej, wolnej od nukleaz. W razie potrzeby odpowiednio przeskaluj ilości. Wlej roztwór do barwiacza Coplina do przetworzenia preparatów.
- Wlej około 200-250 ml środka czyszczącego D-limonen do dwóch barwiaczy upewniając się, że preparaty w statywie na szkiełka będą całkowicie zanurzone.
- Wlej około 200-250 ml bezwodnego etanolu (EtOH) do trzeciego barwiacza.
- Włóż niewybarwione, osadzone na szkiełkach skrawki tkanki do statywu na szkiełka.
- Włóż statyw z preparatami do pierwszego barwiacza z D-limonenem i delikatnie poruszaj statywem przez 10-15 sekund. Zostaw statyw w pierwszym barwiaczu z D-limonenem na 1-2 minuty (łącznie).
- Przenieś statyw z preparatami z pierwszego barwiacza z D-limonenem do drugiego barwiacza z D-limonenem. Delikatnie poruszaj statywem przez 10-15 sekund. Zostaw statyw w drugim barwiaczu z D-limonenem na 2 minuty (łącznie). Upewnij się, że parafina została usunięta, jeśli tak nie jest, zostaw statyw w drugim barwiaczu z D-limonenem na około minutę dłużej.
- Przenieś statyw z preparatami z drugiego barwiacza z D-limonenem do płuczki z EtOH. Delikatnie poruszaj statywem przez 10-15 sekund i wyjmij po 2 minutach.
- Zostaw preparaty na powietrzu do wyschnięcia przez 5-10 minut lub aż będą całkowicie suche, a tkanka nabierze białego koloru (może to potrwać dłużej, w zależności od wielkości tkanki).
- Obrysuj powierzchnię guza na tylnej stronie niewybarwionego(-ych) preparatu(-ów) przez dopasowanie ich do właściwego preparatu wybarwionego H+E i przeniesienie obrysu.
- Zajmując się jednym preparatem na raz nawodnij tkankę na obrysowanym, niewybarwionym preparacie przez zanurzenie szkiełka w 3% roztworze glicerolu.
- Usuń nadmiar glicerolu ze szkiełka za pomocą chusteczek laboratoryjnych.
- Przy przetwarzaniu wielu preparatów użytkownik może pozostawić preparaty do schnięcia na statywie, a w tym czasie zająć się nawadnianiem kolejnych.
- Za pomocą żyłki lub skalpela zdrap i wyrzuć tkankę inną niż nowotworowa otaczającą obrysowany obszar guza.
- Trzymając dłoń jeden koniec szkiełka i opierając drugi na twardej powierzchni pod kątem 45 stopni bierz wypreparowaną tkankę guza brzegiem żyłki. Podczas zbierania tkanka powinna łatwo „zwinąć się” na ostrze.

- Powtórz powyższy krok dla każdego preparatu z tego samego materiału.
Uwaga: Tym samym ostrzem można zebrać wiele niewybarwionych preparatów z jednego materiału FFPE.
- Delikatnie zsuń skrawki tkanki z tego samego materiału do opisanej probówki mikrowirówkowej 1,5 ml.
- Jeśli ją stosujesz, między poszczególnymi próbkami tkanki oczyść igłę do preparowania lub pęsetę przez zanurzenie na kilka sekund w D-limonie i wysuszenie.

11.5 Izolacja RNA

Firma Veracyte zaleca użycie zestawu do izolacji Roche FFPET RNA Isolation Kit lub Veracyte FFPE RNA Extraction Kit, które zostały zweryfikowane do stosowania z oznaczeniem Prosigna.

Możliwe jest użycie z oznaczeniem Prosigna innych zestawów do izolacji RNA, jeśli umożliwiają ekstrakcję RNA z naniesionych na szkiełka skrawków tkanki FFPE raka piersi przy spełnieniu następujących parametrów:

Tabela 6: Specyfikacja zestawu do izolacji RNA

Metryka	Test lub pomiar	Parametry
Stężenie RNA	Gęstość optyczna przy 260 nm	≥ 12.5 ng/ μ l
Całkowita objętość RNA (μ l)	Łączna wymyta objętość	≥ 12 μ l
Czystość RNA	Stosunek gęstości optycznej przy 260 nm do gęstości optycznej przy 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
Zanieczyszczenie DNA	Zawartość genowego DNA w wymytej próbce RNA	≤ 1 ng/ μ l
Integralność RNA	Rozkład rozmiarów wyizolowanych fragmentów RNA	$\geq 90\%$ wyizolowanych fragmentów RNA musi mieć długość > 100 nukleotydów

Przestroga: jeżeli w połączeniu z oznaczeniem Prosigna stosowane jest alternatywna procedura izolacji, przed rutynowym wdrożeniem należy w pełni zwalidować ten konkretny przebieg pracy.

Procedura izolacji RNA dla zestawu do izolacji RNA Roche FFPET Isolation Kit:

- Jeśli stosowany jest zestaw Roche FFPET RNA Isolation Kit, należy przestrzegać określonych niżej opisanych instrukcji producenta dotyczących izolacji RNA.
- Jeśli stosowany jest zestaw Veracyte FFPE RNA Extraction Kit, należy przestrzegać instrukcji dostarczonych przez firmę Veracyte, a następnie kontynuować zgodnie z punktem 11.6
- Jeżeli stosowana jest alternatywna metoda ekstrakcji, należy przestrzegać zwalidowanego protokołu lub protokołu podanego przez producenta, a następnie kontynuować zgodnie z punktem 11.6.

Każda seria zestawu do ekstrakcji RNA wyprodukowana przez firmy Roche Veracyte jest zakwalifikowana do dawania próbek RNA spełniających wstępnie zdefiniowane specyfikacje do diagnostycznych oznaczeń ekspresji genów. Instrukcje odpowiedniego przechowywania, bezpieczeństwa i postępowania patrz arkusz metody / instrukcja obsługi wybranego zestawu do ekstrakcji RNA.

Przygotowanie roztworów roboczych dla zestawu do izolacji RNA Roche FFPET Isolation Kit

- Przed przejściem do trawienia tkanki oraz izolacji RNA przygotuj roztwory robocze:

Przygotowanie roztworów roboczych	
Odczynnik	Procedura
Bufor płuczący Wash Buffer I (WBI)*	Dodaj 15 ml 100% etanolu, gotowy bufor WBI przechowuj w temperaturze od +15 do +25°C.
Bufor płuczący Wash Buffer II (WB2)*	Dodaj 80 ml 100% etanolu, gotowy bufor WBII przechowuj w temperaturze od +15 do +25°C
Proteinase K (PK)	Rozpuść liofilizowany odczynnik Proteinase K w 4,5 ml buforu Reagent Preparation Buffer (RPB). Przygotuj porcje 600 μ l, opis i przechowuj porcje w temperaturze od -15 do -25°C.
Enzym DNase I (DNase I)*	Rozpuść liofilizowany odczynnik DNase I w 740 μ l buforu Reagent Preparation Buffer (RPB). Przygotuj porcje 50 μ l, opis i przechowuj porcje w temperaturze od -15 do -25°C.

Uwaga: Pozycje oznaczone gwiazdką (*) nie są wymagane do czasu po trawieniu tkanki.

Trawienie tkanki dla zestawu do izolacji RNA Roche FFPET Isolation Kit

- Rozmroź wystarczającą liczbę porcji enzymu Proteinase K (PK). Po rozmrożeniu przechowuj porcje na lodzie do czasu, aż będą gotowe do użycia.
Uwaga: Jedna porcja PK o objętości 600 μ l zawiera dość proteiny K na 4 trawienia tkanki.
- Do probówek z tkanką dodaj 100 μ l odczynnika Tissue Lysis Buffer (TLB), 16 μ l 10% SDS i 120 μ l roztworu roboczego Proteinase K.
- Wymieszaj probówki z tkanką mieszałem wirowym przez kilka sekund a następnie odwiruj krótko.
- Inkubuj w temperaturze 55°C przez noc (12–23 godziny).

Izolacja RNA dla zestawu do izolacji RNA Roche FFPET Isolation Kit

- Skontroluj wzrokowo probówki z próbkami w celu stwierdzenia, czy tkanka została całkowicie strawiona. Całkowicie strawiony materiał będzie wyglądał na przejrzysty i nie będzie zawierał w roztworze tkanki, lub tylko niewielką jej ilość.
 - jeśli trawienie jest pełne, przejdź do następnego kroku.
 - jeśli trawienie jest niepełne, dodaj 20 μ l dodatkowego odczynnika Proteinase K i inkubuj przez dodatkową godzinę.
- Krótko odwiruj wszystkie próbki (< 30 sekund w miniwirówce).
- Inkubuj próbki w temperaturze 80°C przez 15 minut.
- Przygotuj lub rozmroź wystarczającą liczbę porcji enzymu DNase. Po rozmrożeniu przechowuj porcje na lodzie do czasu, aż będą gotowe do użycia.
Uwaga: Jedna porcja odczynnika DNase o objętości 50 μ l zawiera dość DNazy na 4 izolacji RNA.
- Rozcieńcz enzym DNase w buforze DNase Incubation Buffer (DIB) Ilość wymagana dla N (liczba) izolacji RNA wynosi: $(N+1) \times 90$ μ l DNase Incubation Buffer + $(N+1) \times 10$ μ l DNase. Rozcieńczony roztwór odczynnika DNase przechowuj na lodzie do użycia.
- Do każdej próbki dodaj 325 μ l buforu Paraffin Binding Buffer (PBB) oraz 325 μ l bezwodnego etanolu i wymieszaj pipetując.
- Odwiruj krótko wszystkie próbki (< 30 sekund w miniwirówce).
- Załącz probówkę filtrującą High Pure Filter Tube na probówkę zbiorczą High Pure Collection.
- Przepipetuj próbkę do górnego zbiorniczka probówki filtrującej unikając pobierania pozostałości tkanki.
- Odwiruj przez 30 sekund przy 6000 $\times g$.
- Załącz probówkę filtrującą High Pure Filter Tube na nową probówkę zbiorczą High Pure Collection (odrzuć poprzednią probówkę zbiorczą zawierającą przesącz).
- Odwiruj przez 2 minuty przy 16 000 $\times g$ do całkowitego osuszenia wełny filtracyjnej.
- Załącz probówkę filtrującą High Pure Filter Tube na nową probówkę zbiorczą High Pure Collection (odrzuć poprzednią probówkę zbiorczą zawierającą przesącz).
- Dodaj 100 μ l rozcieńczonego roztworu DNase do wełny filtracyjnej probówki High Pure Filter Tube i inkubuj przez 15 minut w temperaturze od +15 do +25°C.
- Dodaj 500 μ l roztworu roboczego Wash Buffer I (WBI) do wełny filtracyjnej High Pure, odwiruj przez 20–30 sekund przy 6000 $\times g$, odrzuć przesącz.
- Dodaj 500 μ l roztworu roboczego Wash Buffer II (WB2) do wełny filtracyjnej High Pure, odwiruj przez 20–30 sekund przy 6000 $\times g$, odrzuć przesącz.
- Dodaj 500 μ l roztworu roboczego Wash Buffer II (WB2) do wełny filtracyjnej High Pure, odwiruj przez 20–30 sekund przy 6000 $\times g$, odrzuć przesącz.
- Odwiruj przez 2 minuty przy 16 000 $\times g$ do całkowitego osuszenia wełny filtracyjnej.
- Włóż probówkę High Pure Filter Tube do opisanej probówki mikrowirówkowej 1,5 lub 1,7 ml, wolnej od RNazy.
- Dodaj 30 μ l buforu Elution Buffer (EB) na środek wełny filtracyjnej High Pure.
- Inkubuj przez 1 minutę w temperaturze od +15 do +25°C.
- Odwiruj przez 1 minutę przy 6000 $\times g$ do wymycia RNA z kolumny. Usuń i wyrzuć probówkę filtracyjną High Pure.
- Odwiruj RNA wymyte do probówki zbiorczej przez 2 minuty przy maksymalnej prędkości.
- Przenieś nadsącz do probówki 0,5 ml z zakrętką (bez poruszania znajdujących się na dnie oryginalnej probówki włókien szklanych, które mogły zostać wymyte z wełny filtracyjnej).

11.6 Pomiar stężenia i jakości RNA

- Zmierz stężenie wyizolowanego RNA tego samego dnia roboczego (przechowuj w temperaturze od +2 do +8°C) lub zamroź w temperaturze -70°C lub niższej do użycia.
- Zmierz absorbancję (gęstość optyczną, OD) przy 260 i 280 nm 2 μ l wyizolowanego DNA używając spektrofotometru spełniającego wymagania określone punkcie 10.3 Specyfikacja wyposażenia. Unikaj pipetowania 2 μ l z dna probówki źródłowej na wypadek, gdyby pozostały w niej włókna szklane, których obecność wpłynie na odczyt absorbancji.
- W celu zmierzenia stężenia RNA postępuj zgodnie z instrukcją obsługi producenta spektrofotometru.
- Jeśli jakaś próbka nie spełni warunków minimalnej czystości lub stężenia RNA (tabela 6), odwiruj probówkę z próbką przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości ($> 10\ 000 \times g$), umieść probówkę na lodzie i powtórz pomiar. Jeśli próbka nadal nie spełnia warunków czystości lub stężenia, próbka RNA nie nadaje się do analizy w ramach procedury Oznaczenia Prosigna. Nie używaj w Oznaczeniu Prosigna RNA o niedostatecznej ilości lub jakości.

5. W przypadku, gdy nie są spełnione minimalne wymagania dotyczące stężenia lub czystości (tabela 6), procedurę ekstrakcji RNA można powtórzyć. Użytkownik może dokonać izolacji dodatkowych preparatów z tego samego bloczka FFPE lub wybrać inny bloczek pochodzący od tego samego pacjenta.
6. Jeśli stężenie RNA przekracza 250 ng/μl, przed wykonaniem hybrydyzacji w ramach oznaczenia należy je rozcieńczyć wodą do zastosowań w biologii molekularnej niezawierając RNazy, do stężenia docelowego 200 ng/μl. Użyj zapisanego wyniku OD stosunku 260/280 nierozcieńczonej próbki do określenia, czy rozcieńczona próbka spełnia wymogi minimalnej czystości RNA. Wartość stosunku OD nie może być niższa od 1,7.
7. Jeśli oznaczenia Prosigna nie można wykonać tego samego dnia, zamroź RNA w temperaturze -70°C lub niższej.

11.7 Procedura wykonania oznaczenia

Niniejsza procedura oznaczenia zawiera opis kroków wymaganych do wykonania Oznaczenia Prosigna za pomocą systemu analizy nCounter. Kroki te można podsumować w następujących kategoriach wykonywanych w ciągu dwóch kolejnych dni:

Dzień pierwszy

- Konfiguracja wpisu identyfikatora zestawu barwienia (Run Set Identification, RSID) w aplikacji internetowej.
- Przygotowanie hybrydyzacji RNA z zestawem Prosigna CodeSet (przygotowanie 30 minut, hybrydyzacja 15–21 godzin).

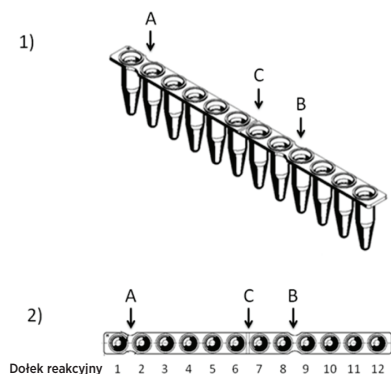
Dzień drugi

- Przygotowanie i pomiar w urządzeniu Prep Station (przygotowanie 20 minut, barwienie 2–3 godziny, w zależności od liczby przetwarzanych próbek).
- Przygotowanie i przeskanowanie kasety w analizatorze cyfrowym (przygotowanie 5 minut, skanowanie 2,5–4,5 godzin na Kasetę, w zależności od liczby przetwarzanych próbek).
- Pobranie raportu (30 minut).

Wybór próbki pacjenta i przygotowanie partii

1. Określ próbki pacjenta, które zostaną przebadane w ramach pomiaru. W jednej partii można umieścić do 10 próbek.
 - a. Każda próbka w partii zostanie przydzielona do unikalnej pozycji w 12-dółkowym pasku próbek używanym do hybrydyzacji. Pozycja zostanie zarejestrowana jako element „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia) w urządzeniu (identyfikator wprowadzany przez oprogramowanie internetowe). Zwróć uwagę, że pozycje 1 i 2 są zarezerwowane dla próbek referencyjnych, a pozycje 3–12 dla próbek RNA guza.
 - b. Załączona ilustracja przedstawia widok z góry (1) i z boku (2) na pasek próbek. Paski próbek są niesymetrycznie oznaczone między dołkami reakcyjnymi 1 i 2 (A) oraz 8 i 9 (B), aby ułatwić zachowanie kolejności próbek podczas przetwarzania. Paski próbek mają również wcięcia między dołkami reakcyjnymi 6 i 7 (C), aby ułatwić rozcięcie paska konieczne, by umożliwić zastosowanie standardowych adapterów wirówkowych.

Rysunek 6: Ilustracja oznaczonych pasków próbek



2. Oblicz ilość RNA i wody (jeśli wymagane), które należy dodać do reakcji hybrydyzacji dla każdej próbki w partii.
 - a. Zalecana ilość RNA do oznaczenia wynosi 250 ng. Dopuszczalny zakres ilości wejściowego RNA do hybrydyzacji wynosi 125–500 ng.
 - b. Wylicz objętość (w mikrolitrach) próbki RNA, jaką należy dodać do reakcji hybrydyzacji przez podzielenie ilości wprowadzanego RNA (np. 250 ng) przez zmierzoną objętość.

- c. Jeśli wyliczone stężenie próbki wynosi od 12,5 ng/μl do 25 ng/μl, dodaj maksymalną objętość 10 μl.
- d. W przypadku próbek, które wymagają objętości mniejsze niż 10 μl, wylicz objętość wody wymaganej do uzyskania łącznej objętości próbki wynoszącej 10 μl.

Przykład: Dla próbki o zmierzonym stężeniu RNA wynoszącym 85 ng/μl, do łącznej masy 250 ng wymagane jest 2,9 μl próbki oraz 7,1 μl wody do uzyskania łącznej objętości 10 μl, zanim zostaną dodane pozostałe odczynniki. W równaniu: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Rejestracja i przetwarzanie próbki

Użytkownik utworzy unikalny „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia) dla każdej partii próbek przez powiązanie identyfikatora próbki z lokalizacją w pasku próbek (pozycje 3–12), korzystając z aplikacji internetowej systemu analizy nCounter. Informacje dotyczące obsługi aplikacji internetowej systemu analizy nCounter, patrz Podręcznik użytkownika systemu.

1. Jeśli RNA zamrożono przed użyciem, przed kontynuacją wykonaj następujące czynności:
 - a. Całkowicie rozmroź próbki RNA i umieść je na lodzie. Odwiruj probówkę z rozmrożoną próbką przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości ($> 10\,000 \times g$) i umieść probówkę z powrotem na lodzie.
 2. Wybierz odpowiednią wielkość zestawu testów Prosigna, na podstawie liczby badanych próbek pacjenta (1, 2, 3, 4 lub 10). Wyciągnij probówkę każdego z następujących odczynników zestawu CodeSet z zamrażarki o temperaturze -80°C do rozmrożenia. Jeśli kolejne kroki nie zostaną wykonane niezwłocznie, odczynniki przechowuj na lodzie.
 - a. Prosigna Reporter CodeSet (zielona nalepka na zatyczce)
 - b. Prosigna Capture ProbeSet (szara nalepka na zatyczce)
 - c. Prosigna Reference Sample (brak nalepki na zatyczce)
 3. Z pudełka CodeSet wyjmij nalepkę kodu partii CodeSet i kodu konfiguracji testu.
 4. Używając przeglądarki internetowej zaloguj się do aplikacji internetowej systemu analizy IVD nCounter i wybierz typ oznaczenia Prosigna, aby rozpocząć przygotowanie cyfrowych formularzy rejestracji.
 5. Na ekranie „Main Menu” (Menu główne) wybierz polecenie „Create New Run Set” (Utwórz nowy zestaw barwienia).
 6. Pierwsze pole wymagane do zdefiniowania barwienia Prosigna to „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia). Wpisz unikalny identyfikator w pole „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia), umożliwiając identyfikację partii próbek.
 7. Przeskanuj lub ręcznie wprowadź „Test Configuration Code” (Kod konfiguracji testu) do aplikacji internetowej. Po przeskanowaniu lub wpisaniu kodu można go wyrzucić.
 8. Przeskanuj lub ręcznie wprowadź „CodeSet Kit Number” (Numer zestawu CodeSet) do aplikacji internetowej.
 9. Następnie wprowadź w odpowiednie pole unikalny identyfikator próbki, która znajduje się w trzeciej pozycji/dołki paska próbek.
 - a. Wprowadź wartość Sample ID (Identyfikator próbki) materiału RNA pacjenta używając skanera kodów kreskowych lub ręcznie wpisując identyfikator za pomocą klawiatury.
 - b. Po wprowadzeniu każdego identyfikatora próbki wypełnij za pomocą menu rozwijanych wszystkie wymagane pola (wielkość guza i stan węzłów) dla próbki, zanim przejdziesz do wprowadzania kolejnej próbki.
 - i. Użyj liczby zajętych węzłów określonej podczas oceny patologicznej pacjenta do wybrania właściwej kategorii węzłowej dla testu (zero, 1–3, ≥ 4).
 - ii. Użyj zmierzonej wielkości guza lub stadium określonego podczas oceny patologicznej pacjentki do wybrania właściwej kategorii rozmiaru guza do testu ($\leq 2 \text{ cm}$ lub $> 2 \text{ cm}$).
 - c. W opcjonalne pole Memo (Notatka) można wpisać dowolny komentarz.
- Uwaga:** Jeśli dołki/pozycje paska próbek nie są wymagane, pozostałe pola należy zostawić puste. Jeśli wymagane są dodatkowe pola dla kolejnych próbek, należy użyć innej konfiguracji testu, uwzględniającej większą liczbę próbek.
10. Po zakończeniu wprowadzania danych dla próbki określ, którzy użytkownicy otrzymają następujące informacje:
 - a. Aktualizację statusu z barwienia w urządzeniach Prep Station i analizator cyfrowy.
 - b. Powiadomienie o dostępności raportu końcowego.
 11. Zapisz gotowy zestaw Run Set (Zestaw barwienia).
 - a. Możesz wydrukować arkusz zestawu barwienia, używając go do śledzenia i weryfikacji próbek.

Procedura reakcji hybrydyzacji

Uwaga: W opisie poniższych kroków przyjęto, że przetwarzane jest dziesięć (10) próbek pacjentów i dwie (2) próbki referencyjne.

Uwaga: Nie wiruj zestawu sond Reporter CodeSet z przyspieszeniem większym niż $3000 \times g$ lub przez więcej niż 10 sekund i nie wiruj „pulsacyjnie”. Takie działanie powoduje osiągnięcie przez wirówkę maksymalnych obrotów i może odwirować odczynnik CodeSet z roztworu.

1. Zaprogramuj blok grzejny używając objętości próbki wynoszącej 30 μ l, obliczonej temperatury bloku i pokrywy oraz ustawienia czasu „forever” (nieskończony) lub odpowiednika. Ustaw temperaturę bloku grzejnego na 65°C i pokrywy na 70°C.

Uwaga: Przy kolejnych krokach wyjątkowo ważne jest zachowanie kolejności, w jakiej próbki dodawane są do paska próbek i zapewnienie ich zgodności z kolejnością zdefiniowaną w zestawie „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia).

2. Opisz dostarczony oznaczony, 12-dołkowy pasek próbek, aby odróżnić pozycje 1–6 od pozycji 7–12 (patrz ilustracja przedstawiająca pasek próbek).
3. Jeśli to konieczne, przetnij pasek próbek na pół tak, by zmieścił się do mini-wirówki z adapterem na pasek próbek.
4. Odpipetuj 10 μ l odczynnika Reference Sample do pozycji 1 i 2 oznaczonego paska próbek.
5. Odpipetuj wyliczoną objętość wody wymaganą dla każdej próbki do odpowiednich pozycji w oznaczonym pasku próbek.
6. Odpipetuj wyliczoną objętość RNA wymaganą dla każdej próbki do odpowiednich pozycji w opisanym pasku próbek, używając nowej końcówki do pipetowania każdej próbki.
7. Po dodaniu próbek pacjenta do paska próbek zaleca się umieszczenie paska próbek w statywie paska próbek, utrzymując kolejność w której próbki dodawano do paska próbek. Umożliwia to weryfikację dodania próbek w zamierzonej kolejności po dodaniu próbek do paska próbek.
8. Po dodaniu do paska próbek wszystkich próbek upewnij się, że w pasku próbek zachowano kolejność próbek (do weryfikacji kolejności próbek można użyć arkusza zestawu barwienia).

- a. W razie potrzeby zmodyfikuj zestaw „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia) używając oprogramowania aplikacji internetowej tak, by był zgodny ostateczną kolejnością (instrukcje dotyczące edycji istniejącego zestawu „Run Set ID” (Identyfikator zestawu barwienia), patrz Podręcznik użytkownika systemu analizy nCounter).

9. Po zweryfikowaniu kolejności próbek umieść poszczególne próbki z RNA z powrotem na lodzie.
10. Przygotuj mieszaninę wyjściową zawierającą 130 μ l Buforu Hybrydyzacyjnego i 65 μ l odczynnika Reporter CodeSet.
Uwaga: Jeśli odczynnik Reporter CodeSet był przechowywany na lodzie, przed dodaniem Buforu Hybrydyzacyjnego odczekaj 1 minutę na osiągnięcie temperatury pokojowej.
11. Wymieszaj przez pipetowanie i krótko odwiruj mieszaninę wyjściową.
Uwaga: Nie dodawaj do mieszaniny wyjściowej odczynnika Capture ProbeSet ORAZ nie przechowuj gotowej mieszaniny wyjściowej na lodzie.
12. Odpipetuj 15 μ l mieszaniny wyjściowej do każdego z 12 dołków. Użyj świeżej końcówki dla każdego dołka.

Uwaga: Po zakończeniu następnego kroku pasek próbek musi zostać w ciągu 15 minut umieszczony w bloku grzejnym o temperaturze 65°C.

13. Dodaj do każdego dołka 5 μ l odczynnika Capture ProbeSet używając nowej końcówki pipety dla każdego dołka.
14. Zatkaj studzienki paska próbek i wymieszaj odczynniki przez kilkakrotne odwrócenie paska próbek i postukanie palcem w celu zapewnienia całkowitego wymieszania.
15. Krótko odwiruj próbki w pasku próbek w wirówce PicoFuge lub miniwirówce (przy $< 3000 \times g$).

Uwaga: Użyj wirówki PicoFuge, która może pomieścić 12-dołkowy pasek próbek lub, jeśli to konieczne, miniwirówki mieszczącej przecięty pasek próbek.

16. Włóż pasek/paski próbek do bloku grzejnego o temperaturze 65°C z ogrzewaną pokrywą. Inkubuj oznaczenia hybrydyzacji w temperaturze 65°C przez 15–21 godzin. Hybrydyzację należy zostawić w temperaturze 65°C do czasu, aż będzie gotowa do przetwarzania w urządzeniu Prep Station.

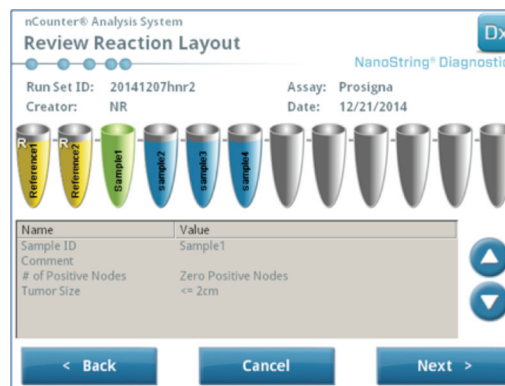
Uwaga: Usuń wszelką niewykorzystaną ilość produktu CodeSet.

Przetwarzanie próbek w urządzeniu nCounter Prep Station

1. Zlokalizuj urządzenie Prep Station powiązane z analizatorem cyfrowym.
2. Wyciągnij Kasetę nCounter z zamrażarki o temperaturze -20°C i pozostaw w woreczku foliowym przez 10–15 minut do osiągnięcia temperatury pokojowej.
Uwaga: Upewnij się, że stosujesz łącznie elementy tej samej partii zestawu.

3. Po osiągnięciu przez Kasetę temperatury pokojowej, wyciągnij ją z woreczka foliowego przed załadowaniem kasety na płytę urządzenia Prep Station.
4. Wyciągnij płytki nCounter Prep Plates z lodówki o temperaturze 4°C i pozostaw przez 10–15 minut do osiągnięcia temperatury pokojowej.
Uwaga: Tylko jedna płytka Prep Plate jest wymagana do barwienia z użyciem zestawu 1-, 2-, 3- lub 4 testów Prosigna.
5. Odwiruj płytki Prep Plates przy $2000 \times g$ przez 2 minuty, aby zebrać płyny na dnie dołków przed załadowaniem płytek Prep Plates na płytę urządzenia Prep Station.
6. W czasie, gdy kasety i płytki ogrzewają się do temperatury pokojowej, przygotuj urządzenie Prep Station za pomocą materiałów eksploatacyjnych z zestawu nCounter Prep Pack.
7. Za pomocą interfejsu ekranu dotykowego urządzenia nCounter Prep Station wybierz przycisk „Diagnostics” (Diagnostyka) dla danego oznaczenia.
8. Na ekranie „Main Menu” (Menu główne) wybierz przycisk interfejsu ekranu dotykowego „Process Samples” (Przetwórz próbki).
9. Przejrzyj listę dostępnych identyfikatorów zestawów barwienia (RSID) w celu potwierdzenia RSID dla obecnie przetwarzanych próbek.
10. Wybierz RSID przez dotknięcie ekranu i wybranie przycisku „Next” (Dalej) interfejsu ekranu dotykowego.
11. Używając interfejsu ekranu dotykowego upewnij się, że wybrano właściwy RSID przez przyjrzenie się każdej z próbek na ekranie i sprawdzenie informacji o próbkach.
 - a. Do śledzenia i weryfikacji próbek może zostać wykorzystany arkusz zestawu barwienia.
 - b. W przypadku wybrania niewłaściwego RSID dotknij przycisku „Back” (Wstecz) i wybierz właściwy RSID.
 - c. Jeśli wybrano właściwy RSID, ale występują błędy wpisów próbek, dotknij przycisku „Back” (Wstecz), przejdź do komputera i zmodyfikuj RSID używając aplikacji internetowej.

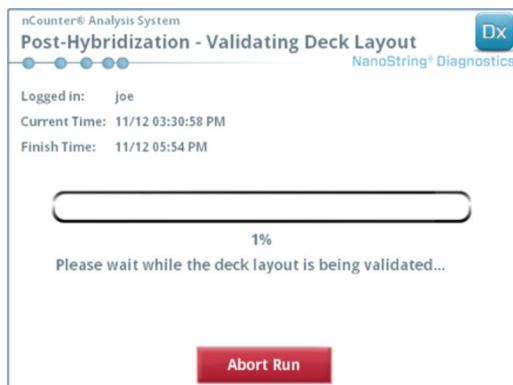
Rysunek 7: Praca z ekranem barwienia w urządzeniu Prep Station



12. Na kilku kolejnych ekranach będą wyświetlane monity o skanowanie żądanych kodów kreskowych identyfikatorów odczynników w otwartych polach lub potwierdzenie rozmieszczenia na płycie wymaganych materiałów eksploatacyjnych. Po wykonaniu każdego zadania wybierz przycisk „Next” (Dalej) na ekranie dotykowym, aby przejść do następnego monitu.
Uwaga: Do barwień z użyciem zestawu Prosigna dla 1, 2, 3 lub 4 testów wymagana jest tylko jedna płytka Prep Plate i jeden pusty pasek próbek grzejnika. W przypadku barwienia zestawów 1, 2, 3 lub 4 testów, załaduj płytkę Prep Plate i pusty pasek próbek do grzejnika we właściwe przednie pozycje (najbliżej użytkownika) płyty urządzenia Prep Station.
13. Wyjmij próbki z bloku grzejnego.
Uwaga: Rozpocznij barwienie w urządzeniu Prep Station w ciągu 15 minut od wyciągnięcia próbek z bloku grzejnego.
14. Włóż pasek/paski próbek do wirówki PicoFuge lub miniwirówce i odwiruj krótko (przy $< 3000 \times g$).
15. Ostrożnie zdejmij zatyczki z paska/pasków próbek.
16. Wcięcia na pasku próbek i prowadnice w urządzeniu Prep Station powinny zachować właściwą kolejność i orientację próbek.
17. Umieść pasek/paski próbek na płycie urządzenia nCounter Prep Station z dołkami w kolejności 1–12 od lewej do prawej. Przy wykonywaniu barwienia z użyciem zestawu 1, 2, 3 lub 4 testów należy umieścić tylko pierwszą połowę paska próbek (dołki 1–6) w uchwycie próbek na płycie, jeśli dotyczy. Należy pamiętać, żeby używać wyłącznie dołków 1–6, druga połowa paska próbek (7–12) nie zmieści się do lewej połowy uchwytu z powodu niezgodności wzoru wcięć.
18. Upewnij się, że pasek próbek jest pewnie osadzony w urządzeniu Prep Station i zamknij metalową pokrywę.
19. Jeśli pokrywa nie zamknie się prawidłowo, podczas weryfikacji układu płyty zostanie wyświetlony monit o jej zamknięciu.
20. Wybierz przycisk „Next” (Dalej) interfejsu ekranu dotykowego.

- Po wyświetleniu monitu zamknij drzwiczki urządzenia i wybierz „Next” (Dalej), aby rozpocząć weryfikację płyty.
- W przypadku wystąpienia błędu postępuj zgodnie z instrukcjami dotyczącymi danego błędu, aby kontynuować weryfikację układu płyty.

Rysunek 8: Weryfikacja układu płyty urządzenia Prep Station po hybrydyzacji



- Po zweryfikowaniu układu płyty wybierz przycisk „Start Processing” (Rozpocznij przetwarzanie) w interfejsie ekranu dotykowego.
Uwaga: W przypadku napotkania problemów z uruchomieniem urządzenia Prep Station przenieś zhybrydizowane próbki do bloku grzejjego, nie przekraczaj jednak maksymalnego czasu 21 godzin.
- Po zakończeniu barwienia postępuj zgodnie z monitami wyświetlanymi na ekranie urządzenia Prep Station.
- Po zakończeniu barwienia przez urządzenie Prep Station ostrożnie wyciągnij kasetę z urządzenia Prep Station i zamknij dołki kasety dostarczoną pokrywą samoprzylepną.
Uwaga: Nie pozostawiaj niezamkniętej kasety w urządzeniu Prep Station na noc.
- Jeśli próbki nie będą skanowane tego samego dnia, przechowuj kasetę w temperaturze 4°C w nieprzezroczystym opakowaniu przez okres do jednego tygodnia.

Skanowanie kasety w analizatorze cyfrowym nCounter

- Zlokalizuj analizator cyfrowy powiązany z urządzeniem Prep Station, w którym przetworzono próbki. Załaduj Kasetę do analizatora cyfrowego nCounter w celu przeskanowania.
 - Otwórz drzwiczki analizatora cyfrowego.
 - Włóż Kasetę do dodania w pustym gnieździe.
 - Zamknij drzwiczki i zapoznaj się z informacjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym.
- W interfejsie ekranu dotykowego analizatora cyfrowego wyświetlanych jest kilka grafik, umożliwiających szybką identyfikację statusu danej pozycji:
 - Puste miejsce: gniazdo jest puste i można do niego załadować nową Kasetę.
 - Kaseta całkowicie niebieska: skanowanie zakończone.**NIE WYJMUJ NASTĘPUJĄCYCH KASET:**
 - Biała kaseta: Gniazdo zawiera zarejestrowaną Kasetę, która nie została jeszcze przeskanowana.
 - Kaseta częściowo niebieska: gniazdo zawiera zarejestrowaną Kasetę, która jest aktualnie skanowana.
- Kasety, których skanowanie ukończono, można wyjąć z analizatora cyfrowego.
- Jeśli jest to pierwsza kaseta załadowana do analizatora cyfrowego, dotknij przycisku „Diagnostics” (Diagnostyka) a następnie wybierz „Main Menu” (Menu główne), aby zalogować się do analizatora cyfrowego. Jeśli analizator cyfrowy skanuje już kasety, przejdź do kroku 9 poniżej.
- Ostrożnie włóż Kasetę do wolnego gniazda analizatora cyfrowego (patrz przewodnik dotyczący stanów pozycji powyżej). Gniazdo i kasety mają kształt ułatwiający wybranie właściwej orientacji. Kod kreskowy będzie skierowany do góry.
- Opuść pokrywę gniazda i dociśnij Kasetę przez otwór w pokrywie aby upewnić się, że kaseta została właściwie osadzona.
- Dotknij przycisk „Start Counting” (Rozpocznij zliczanie) i poczekaj, aż skaner rozpocznie proces zliczania. Po rozpoczęciu przez analizator cyfrowy skanowania kasety rozlegnie się seria cichych, rytmicznych kliknięć.
- Potwierdź, że na pozycji kasety na ekranie został wyświetlony niebieski pasek (w ciągu pięciu minut od rozpoczęcia skanowania), co wskazuje na rozpoczęcie skanu.
- Aby dodać Kasetę do analizatora cyfrowego, który rozpoczął już skanowanie kasety, dotknij przycisk „Pause” (Wstrzymaj) na ekranie „Counting Cartridges” (Zliczanie kasety) i poczekaj, aż analizator cyfrowy wstrzyma bieżące skanowanie.
- Otwórz drzwiczki analizatora cyfrowego.
- Włóż Kasetę do dodania w pustym gnieździe (patrz informacje dotyczące stanu pozycji powyżej).

- Zamknij drzwiczki i naciśnij przycisk „Resume” (Wznów).
- Po zakończeniu skanowania oprogramowanie wyśle raport na adres e-mail określonego wcześniej użytkownika.
- Po otrzymaniu powiadomienia wiadomością e-mail wyjmij zakończoną Kasetę i zutylizuj ją zgodnie z wytycznymi placówki.
Uwaga: Raporty zostaną wygenerowane zarówno dla barwień zakończonych powodzeniem, jak i dla barwień z błędami dotyczącymi kontroli jakości danych (Quality Control, QC). Raporty nie zostaną wygenerowane w przypadku błędu niezwiązanego z kontrolą jakości danych. W przypadku wystąpienia takiego błędu należy skontaktować się z działem Pomocy Technicznej firmy Veracyte.
- Używając łącza zamieszczonego w wiadomości e-mail z powiadomieniem otwórz aplikację internetową i pobierz wszystkie raporty diagnostyczne związane z przetworzonym RSID.
- W przypadku błędów: postępuj zgodnie z zaleceniami zamieszczonym w raporcie testu dla poszczególnych próbek lub błędu systemu.
Uwaga: Niepowodzenia poszczególnych próbek nie są uznawane za błąd systemu.

12 ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW I NIEPOWODZENIA TESTÓW

Tabela 7: Kody błędów wymagające Powtórzenia Testu

Kod błędu:	Opis niepowodzenia	Zalecane działanie
5	Scan Failure (Niepowodzenie skanowania)	Powtórz barwienie próbki używając 250 ng RNA
7	High Signal (Silny sygnał)	Ponownie przygotuj próbkę i powtórz barwienie próbki używając 125 ng RNA
6	Low Signal (Słaby sygnał)	Ponownie przygotuj próbkę i powtórz barwienie próbki używając 500 ng RNA
30	Low Signal (Słaby sygnał)	Ponownie przygotuj próbkę i powtórz barwienie próbki używając 500 ng RNA
31	Low RNA Signal (Słaby sygnał RNA)	Ponownie przygotuj próbkę i powtórz barwienie próbki używając 500 ng RNA

Powód powtórzenia oznaczenia:

- Raport oznaczenia będzie zawierał informacje o próbkach, których oznaczenie nie powiodło się – nie będą dla nich zgłaszane wyniki oznaczenia. W przypadku próbek, których oznaczenie powiodło się, zostaną podane wyniki oznaczenia.
- Raport oznaczenia będzie zawierał informację o typie niepowodzenia oraz działaniach zalecanych w przypadku niepowodzenia oznaczenia. Można ponownie oznaczyć stężenia RNA próbek, których oznaczenie się nie powiodło i ponownie dokonać barwienia próbek (w ramach nowej partii/RSID), w zależności od typu niepowodzenia oraz pozostałej ilości RNA dostępnej do powtórzenia oznaczenia.

13 WYNIKI OZNACZENIA

Oznaczenie Prosigna zawiera serię metryk kontroli jakości automatycznie stosowanych do każdej próbki podczas analizy. Metryki te oceniają wydajność oznaczenia w celu określenia, czy wynik mieści się w granicach oczekiwanych wartości. Po udanej analizie metryk kontroli jakości oznaczenia Prosigna zgłasza następujące wyniki:

Tabela 8: Wyniki i wartości wyjściowe oznaczenia Prosigna

Wynik	Wartości wyjściowe
The Intrinsic Subtype of the Breast Cancer Specimen (Podtyp materiału raka piersi)	Luminal A (Luminalny A) Luminal B (Luminalny B) HER2-Enriched (Z nadekspresją HER2) Basal-Like (Basal)
Individual Estimate of the Probability of Distant Recurrence within 10 years (Indywidualnie szacowane prawdopodobieństwo odległego nawrotu choroby w ciągu 10 lat)	0-100%
Risk of Recurrence (ROR) Score (Wynik ryzyka nawrotu)	Wartość całkowita w skali 0-100
Risk Category (Kategoria ryzyka)	Low (Niskie), Intermediate (Średnie), High (Wysokie)

13.1 Podtypy

Wykazano, że podtyp raka piersi jest powiązany z rokowaniem w raku piersi we wczesnym stadium. Średnio rzecz biorąc u pacjentek w guzem luminalnym A występują znacząco lepsze wyniki niż u pacjentek z guzem luminalnym B, z nadekspresją HER2 lub basal^{2,5}.

Podtyp identyfikuje się przez porównanie profilu ekspresji 50 genów w nieznaną próbkę z oczekiwanymi profilami ekspresji dla czterech podtypów. Nieznanej próbce przypisywany jest podtyp o najbardziej zbliżonym profilu.

Najczęściej spotykane podtypy raka piersi to podtypy luminalne: luminalny A (LumA) i luminalny B (LumB). Wyniki wcześniejszych badań sugerują, że typ luminalny

A obejmuje około 30% do 40%, a typ luminalny B około 20% przypadków raka sutka⁵. Jednakże typy luminalne występują u ponad 90% pacjentek z guzem wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych. Wzór ekspresji genów tych podtypów przypomina luminalny składnik nabłonkowy tkanki sutka⁵. Guzy te charakteryzują się wysoką ekspresją receptora estrogenu (ER), receptora progesteronu (PR) oraz genów związanych z aktywacją ER, takich jak LIV1, GATA3 i cykliny D1, a także ekspresją cytokeratyn luminalnych 8 i 18. Raki sutka typu luminalnego A wykazują niższą ekspresję genów związanych z aktywacją cyklu komórkowego w porównaniu to raka sutka typu luminalnego B, co prowadzi do lepszych rokowań.

Wyniki wcześniejszych badań sugerują, że typ z nadekspresją HER2 (HER2-E) obejmuje około 20% przypadków raka sutka⁵. Jednakże nowotwory z nadekspresją HER2 są zasadniczo ER-ujemne, a więc tylko u 5% badanej populacji pacjentek z guzami ER-dodatnimi stwierdzono występowanie raka sutka z nadekspresją HER2. Niezależnie od statusu ER guzy z nadekspresją HER2 są HER2-dodatnie w większości przypadków z wysoką ekspresją grupy ERBB2, włącznie z ERBB2 i GRB7. Silnej ekspresji ulegają także geny związane z aktywacją cyklu komórkowego.

Opublikowane dane sugerują, że typ z basal obejmuje około 20% przypadków raka sutka⁵. Jednakże nowotwory podstawne są zasadniczo ER-ujemne, a więc tylko u 1% badanej populacji pacjentek z guzami ER-dodatnimi stwierdzono występowanie podstawnego raka sutka. Podtyp basal jest niemal zawsze klinicznie HER2-ujemny i zachodzi w nim ekspresja zestawu biomarkerów „podstawnych”, włącznie z podstawnymi cytokeratynami (CK) nabłonka oraz receptorem nabłonkowego czynnika wzrostu (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Silnej ekspresji ulegają geny związane z aktywacją cyklu komórkowego.

13.2 Wynik ROR

Wynik ROR to wartość całkowita w skali 0-100 powiązana z prawdopodobieństwem wystąpienia u pacjentki odległego nawrotu choroby w ciągu 10 lat, dla zdefiniowanej populacji przeznaczenia do stosowania. Wynik ROR oblicza się przez porównanie profilu ekspresji 46 genów w nieznanej próbce z oczekiwanymi profilami ekspresji dla czterech podtypów, zgodnie z opisem powyżej, do wyliczenia czterech wartości korelacji. Wartości korelacji są następnie łączone z wynikiem proliferacji oraz wielkością guza do wyliczenia wyniku ROR.

13.3 Prawdopodobieństwo odległego nawrotu choroby po 10 latach

Wyniki ROR dla dwóch grup kobiet po menopauzie z rakiem sutka wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium porównano do przeżywalności bez nawrotów po zabiegu i leczeniu w ciągu 5 lat leczenia wspomagającą terapią hormonalną, po którym następował 5-letni okres obserwacji (szczegółowe informacje, patrz punkt 16.4, Wydajność kliniczna). Na podstawie tych badań opracowano model wiążący wynik ROR z prawdopodobieństwem odległego nawrotu choroby w przebadanej populacji pacjentek z 95% poziomem ufności.

13.4 Klasyfikacja ryzyka

Podawana jest również klasyfikacja ryzyka umożliwiająca interpretację wyniku ROR za pomocą odciętych związanych z wynikiem klinicznym w przebadanych populacjach pacjentek.

Tabela 9: Klasyfikacja ryzyka na podstawie zakresu ROR i stanu węzłów

Stan węzłów	Zakres ROR	Klasyfikacja ryzyka
Węzły wolne	0-40	Niskie
	41-60	Średnie
	61-100	Wysokie
Węzły zajęte (1-3 węzły)	0-15	Niskie
	16-40	Średnie
	41-100	Wysokie
Węzły zajęte (≥ 4 węzły)	0-100	Wysokie

13.5 Kontrola jakości

Każda seria składników Oznaczenia Prosigna jest testowana z zastosowaniem wstępnie określonych specyfikacji. Wszystkie elementy zestawu można przypisać do serii, a kluczowe elementy każdego zestawu są testowane łącznie i wypuszczane jako seria zestawu Prosigna.

Zestaw Oznaczenia Prosigna zawiera serię kontroli wewnętrznych używanych do oceny jakości każdego zestawu pomiarowego jako całości oraz każdej poszczególniej próbki. Kontrole te zostały opisane poniżej.

Zestaw kontroli partii: referencyjna próbka RNA z transkrypcji *in vitro*

Zestaw Oznaczenia Prosigna zawiera kontrolę w postaci próbki referencyjnej syntetycznego RNA. Próbka referencyjna zawiera docelowe RNA z transkrypcji *in vitro* dla 50 genów algorytmu i 8 genów „porządkowych”. Próbka referencyjna

jest przetwarzana w dwóch kopiach w każdym barwieniu oznaczenia Prosigna wraz z zestawem do 10 nieznanych próbek RNA raka sutka w pasku próbek do pomiaru 12 reakcji. Aby zakwalifikować barwienie, sygnał próbki referencyjnej jest analizowany względem predefiniowanych wartości progowych.

Sygnał każdego z 50 genów algorytmu RNA raka sutka jest normalizowany do odpowiadających im genów próbki referencyjnej.

Zestaw kontroli dodatniej: docelowe RNA transkrybowane *in vitro* i odpowiadające im sondy Capture i Reporter Probe.

W oznaczeniu Prosigna jako kontrola dodatnia używane jest syntetyczne docelowe RNA. Sekwencje docelowe kontroli dodatniej wywodzą się z biblioteki sekwencji DNA External RNA Control Consortium (ERCC)⁶. Sekwencje docelowe RNA zostały transkrybowane *in vitro* z plazmidów DNA. W zestawie oznaczenia znajduje się sześć sekwencji docelowych RNA w 4-krotnej serii miareczkowania (stężenie końcowe w reakcji hybrydyzacji wynosi 128-0,125 fM) wraz z odpowiednimi dla nich sondami Capture i Reporter Probe. Kontrole dodatnie dodawane są do każdej próbki RNA raka sutka i próbki referencyjnej badanej oznaczeniem Prosigna. Próbka zostanie zdyskwalifikowana z dalszej analizy, jeśli natężenie sygnału z próbek kontrolnych nie spełnia predefiniowanych wartości progowych.

Zestaw kontroli ujemnej: egzogenne próbki bez sekwencji docelowych

Sekwencje docelowe kontroli ujemnej wywodzą się z biblioteki sekwencji DNA ERCC⁶. W ramach zestawu oznaczenia umieszczono sondy zaprojektowane do wykrywania sekwencji docelowych bez odpowiadających im sekwencji docelowych. Kontrole ujemne dodawane są do każdej próbki RNA raka sutka i próbki Referencyjnej badanej oznaczeniem Prosigna jako element procedur kontroli jakości. Próbka zostanie zdyskwalifikowana z dalszej analizy, jeśli natężenie sygnału z próbek kontroli ujemnych nie spełnia predefiniowanych wartości progowych.

Zestaw kontroli integralności RNA: geny „porządkowe”

W ramach zestawu Prosigna zamieszczono sondy wychwytyjące Capture Probe i reporterowe Reporter Probe zaprojektowane do wykrywania 8 genów porządkowych i 50 genów algorytmu. Poziom ekspresji 8 genów porządkowych jest analizowany w celu określenia jakości RNA wyekstrahowanego z próbki tkanki FFPE i wprowadzanego do oznaczenia Prosigna. Próbka zostanie zdyskwalifikowana z dalszej analizy, jeśli poziom ekspresji genów porządkowych jest niższy od predefiniowanych wartości progowych.

Geny porządkowe używane są też do normalizacji różnic w ilości nietkniętego RNA w próbce przed normalizacją względem próbki Referencyjnej.

14 OGRANICZENIA PROCEDUR

- Oznaczenie Prosigna zostało zoptymalizowane do identyfikacji podtypów wewnętrznych raka sutka, ryzyka wystąpienia odległego nawrotu choroby po 10 latach, wyniku ROR oraz kategorii ryzyka na podstawie oczyszczonego RNA wyekstrahowanego z utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki ludzkiego raka sutka. Nie testowano innych typów materiałów lub środków utrwalających i nie należy ich stosować.
- Wydajność oznaczenia Prosigna zweryfikowano stosując wyłącznie procedury opisane w niniejszej ulotce. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność testu.
- Charakterystyka wydajności oznaczenia Prosigna została określona dla kobiet po menopauzie z rakiem sutka wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium leczonym 5-letnią wspomagającą terapią hormonalną. Nie ustalono wydajności z innymi sposobami leczenia oraz dla innych populacji pacjentów.
- Jeśli do oznaczenia zostanie dodane RNA o niedostatecznej ilości lub jakości, oznaczenie Prosigna może nie móc uzyskać prawidłowego wyniku i zamiast tego zgłosić niepowodzenie oznaczenia.
- Interpretacja wyników oznaczenia Prosigna (typ wewnętrzny, wynik ROR, kategoria ryzyka) powinna zostać oceniona w kontekście innych czynników kliniczno-patologicznych, historii medycznej pacjentki oraz wyników innych testów laboratoryjnych.
- Wydajność oznaczenia Prosigna została ustalona z RNA spełniającym wymagania zdefiniowane w odniesieniu do procedury powyżej. Nie ustalono wydajności z wyizolowanym RNA, które nie spełnia tych parametrów.
- Substancje, o których wiadomo, że zakłócają oznaczenie Prosigna obejmują DNA genowe oraz tkankę inną niż nowotworowa (np. tkanka prawidłowa). Przed rozpoczęciem procedury należy zapoznać się z uwagami ogólnymi oznaczenia. Przed wykonaniem procedury obszar żywotnego raka inwazyjnego musi zostać jednoznacznie zidentyfikowany przez patologa. Ponadto każdą próbkę RNazy należy poddać działaniu DNazy. W przypadku stosowania zestawu do izolacji innego niż Roche FFPE RNA przed przejściem do wykonania analiz próbek pacjenta każdą nową serię DNazy należy przetestować i zakwalifikować zgodnie z dostarczoną specyfikacją.

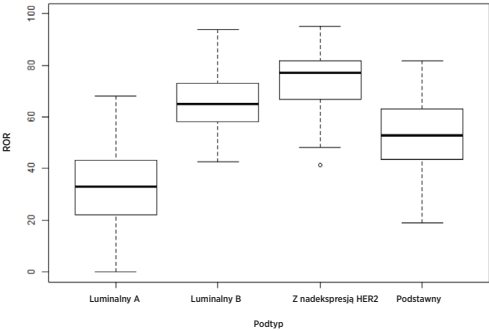
15 WARTOŚCI OCZEKIWANE

Oznaczenie Prosigna zgłasza wynik ROR (0-100), typ wewnętrzny (luminalny A, Luminalny B, z nadekspresją HER2 lub basal) oraz kategorię ryzyka (niskie, średnie lub wysokie) dla każdej próbki nowotworu. Na podstawie dwóch, opisanych poniżej klinicznych badań weryfikacyjnych przeprowadzonych u kobiet z rakiem sutka wykazujących ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium leczonych anastrozolem lub tamoksyfemem w badaniach ATAC i ABCSG-8 przedstawiono oczekiwany zakres i częstotliwość wyników ROR (rysunek 10), ciągły związek ROR z prawdopodobieństwem nawrotów na podstawie stanu węzłów (rysunek 11) i rozkład wyników ROR w zależności od podtypu wewnętrznego (rysunek 9). W klinicznych badaniach weryfikacyjnych uzyskano dane, które posłużyły do przedstawienia czasu przeżycia bez przerzutów w ciągu 10 lat w zależności od kategorii ryzyka: rysunek 12 (pacjentki bez zajętych węzłów chłonnych) i rysunek 13 (pacjentki z zajętymi węzłami, 1-3 węzły).

15.1 Zakres ROR w zależności od podtypu

Rysunek 9 prezentuje wykres skrzynkowy wyniku ROR względem podtypu wewnętrznego.

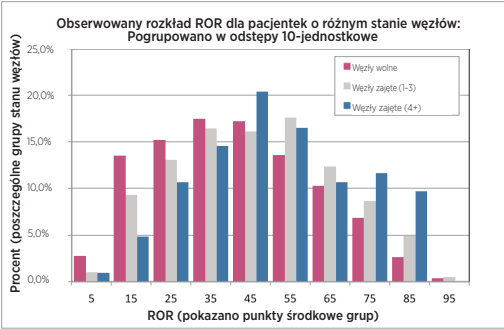
Rysunek 9: Wykres skrzynkowy wyniku ROR względem podtypu wewnętrznego.



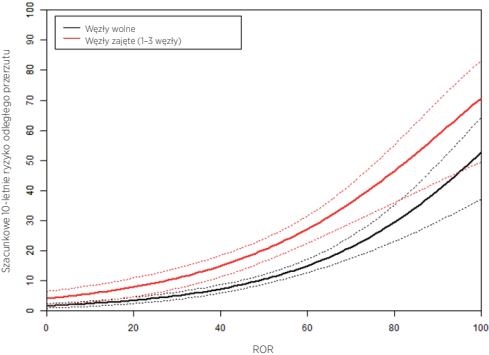
15.2 Częstotliwość wyniku ROR względem stanu węzłów

Histogram na rysunku 10 wygenerowano używając pojedynczego modelu Cox'a obejmującego wynik ROR i zmienne katagoryczne do rozróżnienia trzech grup zajęcia węzłów chłonnych.

Rysunek 10: Histogram wyniku ROR względem stanu węzłów



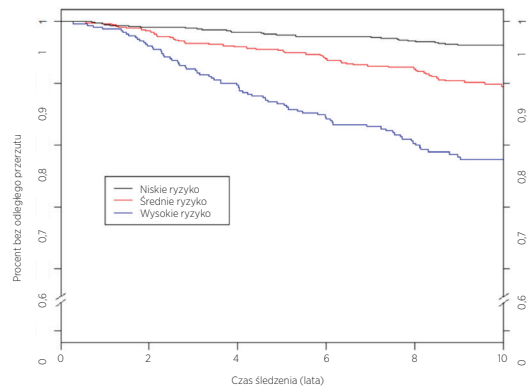
Rysunek 11: Przewidywane dziesięcioletnie ryzyko szacowane w ramach grupy stanu węzłów



15.3 Przeżywalność bez nawrotów względem kategorii ryzyka

Przedstawione dane pochodzą z połączonej analizy badań TransATAC i ABCSG-8. W celu przydziału pacjentek do grup ryzyka wyniki ROR porównano do predefiniowanych progów ryzyka dla pacjentek o wolnych lub zajętych węzłach chłonnych. Rysunki 12 i 13 prezentują 10-letnią przeżywalność bez nawrotów dla każdej kategorii ryzyka względem stanu węzłów.

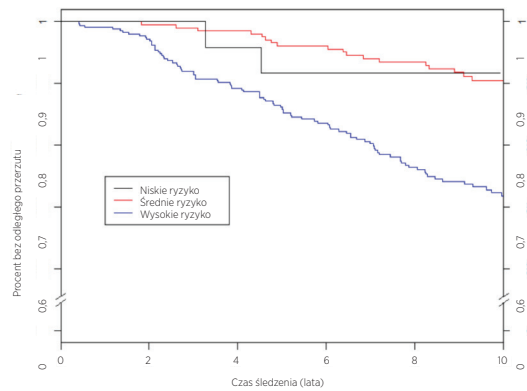
Rysunek 12: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi



Podsumowanie danych z rysunku 12: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	875 (49%)	31	96,2% [94,7%-97,3%]
Średnie	551 (31%)	53	89,2% [86,1%-91,7%]
Wysokie	360 (20%)	73	77,7% [72,8%-81,9%]
Razem	1786 (100%)	157	

Rysunek 13: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły)



Podsumowanie danych z rysunku 13: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły)

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	24 (4%)	2	91,7% [70,6%-97,8%]
Średnie	211 (36%)	18	90,4% [85,2%-93,9%]
Wysokie	355 (60%)	87	71,8% [66,3%-76,6%]
Razem	590 (100%)	107	

Tabela 10: Wskaźniki dziesięcioletniego DRFS dla pacjentek z 4 lub więcej zajętymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Wysokie	103	39	57,4% [46,3%-67,0%]

16 CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

16.1 Precyzyja analityczna i powtarzalność

W celu oceny ogólnej precyzji i powtarzalności oznaczenia Prosigna przeprowadzono dwa badania, których wyniki połączono. Pierwsze z nich było badaniem precyzji w systemie analizy nCounter, wychodząc z wyekstrahowanego RNA raka sutka, natomiast drugie było badaniem powtarzalności, wychodząc z tkanki FFPE raka sutka, które obejmowało czynniki preanalityczne.

Precyzyja oznaczania RNA

16.1.1 Schemat badania

W celu oceny precyzji analitycznej przeprowadzono trzyośrodkowe, zaślepione i randomizowane badanie porównawcze z użyciem oznaczenia Prosigna w systemie analizy nCounter. Ze zarchiwizowanych materiałów FFPE przygotowano pięć pul RNA raka sutka do testów w każdym ośrodku. Panel próbek odzwierciedlał prototypowe profile ekspresji genów napotykane podczas rutynowych testów i każdą z grup klasyfikacji ryzyka.

Każdy ośrodek wykonał 18 poprawnych barwień (9 barwień na operatora, każde barwienie obejmowało 10 testów) po wykonaniu przez każdego operatora barwienia umożliwiającego zaznajomienie się z oznaczeniem (tabela 11). W każdym z barwień każdą próbkę badano w dwóch egzemplarzach przy znamionowym poziomie wejściowym RNA wynoszącym 250 ng na oznaczenie. Każdy operator przeprowadził jedno barwienie danego dnia, zgodnie z ogólnie przyjętym standardem dla metod wymagających długich czasów barwienia⁷. Łączny czas badania, wliczając czas na zapoznanie się z metodą, objął ponad 4 tygodnie w każdym z ośrodków.

Tabela 11: Podsumowanie badania precyzji oznaczania RNA

Zmienna badania	Wartość
Liczba próbek RNA raka sutka	5
Liczba powtórzeń próbek na barwienie (ta sama kasetę)	2
Liczba barwień/ośrodek	18
Liczba barwień dziennie	1
Liczba operatorów/ośrodek	2
Liczba serii odczytnika/ośrodek	3
Liczba ośrodków	3
Łączna liczba próbek zbadanych przez ośrodek (nie licząc zaznajomienia się)=	180
Łączna liczba próbek =	540

16.1.2 Analiza komponentów wariacyjnych

Tabela 12 przedstawia wyniki analizy komponentów wariacyjnych dla każdego elementu panelu. Pod szacunkową wariancją zamieszczono procent wariancji całkowitej (w nawiasie).

Tabela 12: Komponenty wariacyjne dla elementów panelu (pula próbek RNA)

Element panelu wg. ryzyka, podtypu	Średnia ROR	Komponent wariacyjny					Łączna wariancja	Łączna SD
		Seria	Ośrodek	Operator	Barwienie	W ramach barwienia		
Niskie, luminalny A	31,4	0,010 (2%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (30%)	0,296 (67%)	0,44 (100%)	0,66
Średnie luminalny B	55	0,105 (18%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (8%)	0,426 (74%)	0,576 (100%)	0,76
Średnie, podstawny	55,4	0,059 (20%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (15%)	0,194 (65%)	0,299 (100%)	0,55
Wysokie, luminalny B	64,8	0,119 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,380 (66%)	0,576 (100%)	0,76
Wysokie z nadekspresją HER2	76,2	0,165 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (63%)	0,442 (100%)	0,66

Dla wszystkich pięciu elementów panelu łączna wartość odchylenia standardowego (SD) wynosiła mniej niż 1 jednostkę ROR w skali 0-100. Dla wszystkich elementów panelu zdecydowanie największy udział w wariancji miała wariancja w ramach pomiaru (powtarzalność). Nie zaobserwowano niemal żadnej wariancji między ośrodkami lub między operatorami. Test stosunku wiarygodności dla istotności ośrodka względem elementu panelu wykazał, że różnice między ośrodkami były nieistotne statystycznie (p > 0,05). Dla każdej serii średnie wyniki ROR odległe są o mniej niż 1 jednostkę ROR dla każdego elementu panelu, co daje średnio około 20% udział w całkowitej wariancji.

16.1.3 Zgodność rozpoznawania podtypu i klasyfikacji ryzyka

Dla wszystkich elementów panelu stwierdzono 100% zgodność między wynikiem podtypów a wewnętrznym podtypem elementu panelu. Dla wszystkich próbek stwierdzono 100% zgodność między zmierzoną a oczekiwaną grupą ryzyka.

Powtarzalność dla tkanki

16.1.4 Schemat badania

Przeprowadzono trzyośrodkowe, zaślepione i randomizowane badanie porównawcze materiału próbek tkanki raka sutka pobranych z tego samego bloczka FFPE z użyciem oznaczenia Prosigna w systemie analizy nCounter. W ramach badania przetestowano zestaw 43, niedawno pobranych materiałów FFPE raka sutka od pacjentek z rakiem sutka wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych o potwierdzonym inwazyjnym raku przewodowym i/lub zrazikowym. Wszystkie materiały tkanki zostały przesłane do właściwych ośrodków do przetworzenia. 43 materiały zostały ocenione niezależnie przez trzech patologów. Dla każdej próbki tkanki ocenionej przez patologa wykonano pomiar obejmujący preparację tkanki, ekstrakcję RNA i test za pomocą oznaczenia Prosigna, przeprowadzony przez jednego operatora w każdym ośrodku, stosującą zdefiniowaną procedurę oznaczenia. RNA wyizolowane z każdej próbki tkanki przetestowano dwukrotnie w osobnych seriach oznaczeń. Do przeprowadzenia tego badania użyto trzech serii zestawu do izolacji RNA (po jednym na ośrodek) oraz jednej serii odczytników zestawu oznaczenia. Pojedynczy preparat był źródłem do ekstrakcji RNA gdy zmierzona powierzchnia guza miała wielkość ≥ 100 mm², a 3 preparaty, gdy zmierzona powierzchnia guza miała wielkość < 100 mm², przy minimalnej wymaganej powierzchni guza wynoszącej 4 mm².

16.1.5 Podsumowanie testów

Wskaźnik decyzji dla czterdziestu trzech (43) materiałów tkankowych ocenianych w każdym z trzech ośrodków przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13: Wskaźnik decyzji w każdym z ośrodków

Ośrodek	Procent z wynikami	Zaliczone/łącznie
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

Czterdzieści materiałów zapewniło wyniki we wszystkich ośrodkach (izolacja RNA jednej próbki w jednym z ośrodków musiała być powtórzona), 1 materiał zapewnił wyniki w 2 ośrodkach i 2 materiały zapewniły wyniki w jednym ośrodku. Sto procent (100%) próbek, które zostały zaliczone w przeglądzie tkanki i specyfikacji izolacji RNA zapewniło dopuszczalne wyniki w oznaczeniu Prosigna. Zmierzona powierzchnia guza dla 4/5 niepowodzeń izolacji RNA wyniosła ≤ 15 mm², co równało się mniej niż 50 mm² całkowitej powierzchni tkanki wprowadzanej do testu.

43 materiały pochodziły od pacjentek zarówno z wolnymi, jak i zajętymi węzłami chłonnymi. Wyliczone wyniki testu z 43 materiałów reprezentują szeroki zakres (94 jednostki) wyników ROR, wszystkie 4 podtypy oraz wszystkie kategorie ryzyka po zastosowaniu do wszystkich materiałów odcień dla wolnych lub zajętych węzłów. Dwie próbki, dla których wyniki uzyskano tylko w jednym ośrodku zostały wykluczone z dalszych analiz statystycznych, ponieważ brakowało dla nich danych porównawczych z innych ośrodków.

16.1.6 Analiza komponentów wariacyjnych

Nie stwierdzono istotnych statystycznie (α = 0,05) różnic między kategoriami ryzyka po zastosowaniu nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa, co znaczy, że model komponentów wariacyjnych pasował równocześnie dla wszystkich kategorii ryzyka.

Tabela 14 przedstawia wyniki analizy komponentów wariacyjnych z użyciem wszystkich 41 materiałów tkankowych.

Tabela 14: Komponenty wariacyjne (badanie powtarzalności tkanki)

Ośrodek	Komponent wariacyjny			Łączna SD
	W ramach bloczku	Resztowy	Razem	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Składnik ośrodka mierzy systematyczną wariancję swoistą dla ośrodka, składnik „w ramach bloczku” mierzy losową wariancję zmieniającą się w funkcji przeglądu/przetwarzania materiału próbki lub wariancję w ramach bloczku FFPE, a wariancja resztowa mierzy połączoną zmienność między analizami i zmienność w ramach analizy w Oznaczeniu Prosigna. Składnik ośrodka jest bardzo mały względem zmienności losowej w ramach bloczku, co wskazuje, że średnie różnice między ośrodkami były zaniedbywalne (< 1% całkowitej zmienności). Zmienność resztowa była spójna z równowagą zmiennością zmierzoną w badaniu precyzji oznaczania RNA, które obejmowało mniej próbek, jednak uzyskało bardziej powtarzalne pomiary (zmienność 0,51 w porównaniu do średniej pojedynczego ośrodka w ramach serii odczytnika Prosigna wynoszącej 0,39 dla badania precyzji oznaczania RNA).

Tabela 15 zawiera podsumowanie całkowitej zmienności z użyciem sumy zmienności przetwarzania tkanki (elementy ośrodka i w ramach bloczka z tabeli 14 dla tego badania) oraz całkowitej zmienności przetwarzania RNA z badania precyzji oznaczania RNA (uśrednionej dla pięciu testowanych elementów puli w tabeli 12). Głównym źródłem zmienności dla testu są czynniki przedanalizacyjne związane z przetwarzaniem tkanki (94% całkowitej zmienności). Łączna SD obejmująca wszystkie źródła zmienności wynosi 2,9, co wskazuje, że oznaczenie Prosigna jest wiarygodną miarą różnicy między dwoma wartościami ROR różnymi o 6,75 z 95% poziomem ufności.

Tabela 15: Zmienność całkowita (przetwarzanie tkanki i RNA)

Zmienność przetwarzania tkanki	Zmienność przetwarzania RNA	Zmienność całkowita	Łączna SD
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Zgodność klasyfikacji kategorii ryzyka i podtypu

Zgodność między ośrodkami względem podtypu pacjentki i klasyfikacji ryzyka (niskie/średnie/wysokie ryzyko) została przedstawiona w tabeli 16, gdzie do wszystkich materiałów zastosowano właściwie progi odcięcia ryzyka dla klasyfikacji wolnych i zajętych węzłów chłonnych. W nawiasach klamrowych zamieszczono 95% przedziały ufności dla dokładnego typu, a w nawiasach okrągłych podano liczbę próbek z wynikami w obu ośrodkach. Ostatnia kolumna zawiera średnią zgodność. Dla każdego porównania zgodność obliczano w dwóch krokach. Najpierw dla każdej próbki tkanki wyliczano zgodny udział czterech możliwych par wyników (dwa w ośrodku 1 * dwa w ośrodku 2). W drugim kroku te udziały uśredniano dla wszystkich próbek tkanki, które wygenerowały wyniki w obu ośrodkach w danym porównaniu.

Tabela 16: Podsumowanie zgodności podtypu i kategorii ryzyka względem stanu węzłów

Typ porównania	Zgodność par			Zgodność średnia
	Ośrodek 1 vs ośrodek 2 (n = 40)	Ośrodek 1 vs ośrodek 3 (n = 41)	Ośrodek 2 vs ośrodek 3 (n = 40)	
Podtyp	96,3% [86,4%-99,5%]	98,8% [91,0%-100%]	95% [83,1%-99,3%]	97%
Risk Category (Kategoria ryzyka) Węzły wolne	87,5% [73,2%-95,8%]	92,7% [80,1%-98,4%]	90% [76,4%-97,2%]	90%
Kategoria ryzyka Węzły zajęte	88,8% [75,9%-96,0%]	92,7% [80,1%-98,4%]	91,3% [79,2%-97,4%]	91%

Dla każdego porównania (podtyp i kategorii ryzyka węzły wolne oraz węzły zajęte), średnia zgodność między ośrodkami wynosiła przynajmniej 90%. Nie było próbek, dla których kategoria ryzyka zmieniła się z niskiego na wysokie ryzyko (lub odwrotnie) między lub w ramach ośrodków. Wystąpiły tylko dwa materiały (z 41), które nie uzyskały identycznych podtypów dla wszystkich 6 powtórzeń:

1. Jednak próbka uzyskała podwójne wyniki „luminalny A” w jednym ośrodku i podwójne wyniki „luminalny B” w każdym z pozostałych dwóch ośrodków.
2. Jednak próbka uzyskała podwójne wyniki „luminalny A” w jednym ośrodku podwójne wyniki „z nadekspresją HER2” w drugim ośrodku i po jednym „luminalny A” i „z nadekspresją HER2” w trzecim ośrodku.

16.2 Czułość/wejściowe RNA

Opis badania wejściowego RNA

W badaniu przetestowano 13 próbek RNA raka sutka o trzech poziomach wejściowych RNA w ramach specyfikacji oznaczenia (500, 250 i 125 ng) oraz dwa dodatkowe poziomy wejściowego RNA poza specyfikacją (625 i 62,5 ng). Każdą próbkę przetestowano każdą serią zestawu (łącznie 2 serie) w jednym wykonanym teście obejmującym podwójne pomiary dla każdego poziomu w specyfikacji i pojedynczy pomiar dla każdego poziomu spoza specyfikacji. W każdym pomiarze testowym uwzględniono podwójne ślepe próby (tj. bez sekwencji docelowych). Jedną próbkę przetestowano tylko jedną serią.

Wyniki badania wejściowego RNA

Wszystkie zmierzone ślepe próbki (n = 46) znalazły się poniżej progu sygnału i uzyskały w teście wynik odrzucenia (0% wskaźnik rozpoznania). Wszystkie pomiary RNA nowotworu w ramach specyfikacji oznaczenia (n = 138) uzyskały w teście wynik zaliczający (100% wskaźnik rozpoznania). Sto procent (100%) materiałów z ilością powyżej specyfikacji (625 ng) uzyskało zaliczający wynik testu. Osiemdziesiąt trzy procent (83%) materiałów (10/12) zbadanych przy poziomie wejściowym poniżej specyfikacji (62,5) uzyskało dodatni wynik testu w serii 1 i 100% w serii 2.

Średni wynik ROR dla 13 próbek obejmował szeroki zakres (20–82). Klasyfikacja grupy ryzyka (niskie/średnie/wysokie) była w 100% zgodna dla wszystkich poziomów wejściowych RNA dla 13 zbadanych próbek. Tabela 17 zawiera zestawienie

zmienności wyniku ROR w funkcji ilości wejściowego RNA. Średnia różnica wyniku ROR między poziomami wejściowymi RNA, odchylenie standardowe (SD) różnic oraz 90% poziom ufności wykorzystano do oceny, czy wyniki ROR generowane z różnych poziomów wejściowych RNA są równoważne wynikom uzyskanym dla poziomu wejściowego 250 ng. Aby spełnić kryterium akceptacji, poziom ufności musiał mieścić się w przedziale od -3 do 3 ROR. Przy dwóch skrajnych poziomach w ramach specyfikacji oznaczenia (125 i 500 ng RNA) wyniki ROR były równoważne uzyskanym przy docelowym stężeniu wejściowym równym 250 dla każdej z testowanych serii zestawów. Dla każdego poziomu poza specyfikacji oznaczenia wyniki ROR były równoważne dla jednej serii, ale nie dla drugiej.

Tabela 17: Podsumowanie różnic wyniku ROR Liczba oznacza liczbę próbek uwzględnionych w analizie.

Seria zestawu	Masa (ng)	Liczba	Średnia różnica ROR	SD różnicy	Dolna granica ufności	Górna granica ufności
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

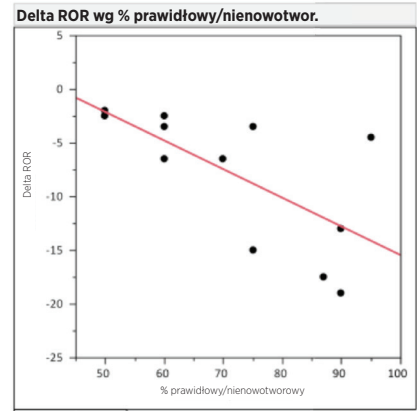
16.3 Badanie zaburzeń

Przyległa tkanka prawidłowa/nie nowotworowa

Przyległa tkanka prawidłowa/nie nowotworowa powszechnie występuje w bloczkach FFPE raka sutka i może zostać zidentyfikowana w przeglądzie patologicznym jako obszar różniący się od obszaru inwazyjnego raka sutka. Opisana powyżej procedura oznaczenia Prosigna wymaga usunięcia przyległej tkanki prawidłowej za pomocą preparowania. W celu oceny ryzyka zanieczyszczenia normalną tkanką dla wyników testu, łącznie 13 bloczków FFPE raka sutka zawierających potwierdzony patologicznie, inwazyjny rak przewodowy oraz około 50–95% przyległej tkanki prawidłowej/nie nowotworowej przetestowano z wykonaniem preparowania i bez preparowania przyległej tkanki, a następnie określono różnicę w wyniku ROR (delta ROR).

Średnio wartość ROR próbki nowotworu po preparacji była o prawie 8 jednostek ROR wyższa od obserwowanej w przypadku nieusunięcia tkanki prawidłowej/nie nowotworowej. Rysunek 14 ilustruje ten fakt w funkcji wzrostu ilości tkanki prawidłowej (do 95% nieusuniętej przez preparowanie): istnieje rosnące ryzyko, że zgłaszana wartość ROR zostanie niedoszacowana lub uzyska negatywne odchylenie (do -19 jednostek ROR) przy ocenie ryzyka nawrotu dla pacjentki.

Rysunek 14: Wpływ tkanki prawidłowej/nie nowotworowej na wartość delta ROR



Zakłócenia tkanki martwiczej, krwotocznej i DCIS

W celu oceny ryzyka zanieczyszczenia tkanką martwiczą/krwotoczną/DCIS (rak przewodowy in situ) dla wyników testu, łącznie 11 bloczków FFPE raka sutka (3 DCIS, 5 martwiczych, 3 krwotoczne) zawierających potwierdzony patologicznie, inwazyjny rak przewodowy oraz około 10–30% czynnika zakłócającego przetestowano z wykonaniem preparowania i bez preparowania czynnika zakłócającego, a następnie określono różnicę w wyniku ROR (delta ROR). Przy badanych poziomach wpływ krwi/tkanki krwotocznej, DCIS oraz tkanki martwiczej uwzględnionej w procedurze miał pomijalny wpływ na zgłaszany wynik ROR (< 6 jednostek ROR). Zaobserwowano 100% zgodność w przydziale kategorii ryzyka między jedenastoma próbkami z tkanką martwiczą, krwotoczną i DCIS z preparacją i bez.

Ludzkie DNA genomowe

Procedura Oznaczenia Prosigna obejmuje usunięcie ludzkiego DNA genomowego (gDNA) przez trawienie enzymem DNase. W celu oceny ryzyka zanieczyszczenia gDNA na wyniki testu zbadano dziesięć (10) blozków FFPE raka sutka zawierających patologicznie potwierdzony inwazyjny przewodowy rak sutka z usunięciem genomowego DNA i bez, przez pominięcie w procedurze kroku z DNazą. W zbadanych próbkach wynik ROR był średnio 4 do 5 jednostek niższy w grupach ryzyka Niskie i Średnie po usunięciu gDNA za pomocą enzymu DNase I (patrz tabela 18). Gdy próbki, które nie zostały potraktowane enzymem DNase zostały poddane jego działaniu (po obróbce), wyniki ROR były zgodne z wartościami ROR obserwowanymi oryginalnie w próbkach poddanych działaniu DNase zgodnie z protokołem. W obecności gDNA istnieje ryzyko, że zgłoszony wynik ROR będzie przeszacowany lub będzie miał odchylenie dodatnie (do 7 jednostek ROR) w zakresie szacunku ryzyka nawrotu u pacjentki. Ponadto wyliczony sygnał dla próbek nie poddanych działaniu DNase I był znacząco ($p < 0,05$) niższy niż dla próbek poddanych działaniu enzymu DNase I, co wynikało z interferencji w odczycie absorbancji używanym do ilościowego oznaczenia RNA przed badaniem oznaczeniem Prosigna.

Tabela 18: Wpływ poddania działaniu enzymu DNase na wartość ROR w próbkach nowotworu

ROR Kategoria	Badane próbki FFPE	Różnica ROR z DNase I – bez DNase I			Różnica ROR z DNase I – z DNase I (po obróbce)		
		Średnia	Min.	Maks.	Średnia	Min.	Maks.
Niskie	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Średnie	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Wysokie	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Wydajność kliniczna

Przeprowadzono dwa kliniczne badania weryfikacyjne w celu walidacji oznaczenia prognostycznej sygnatury genowej raka sutka Prosigna. Głównym celem obu badań była weryfikacja opublikowanych obserwacji, według których wynik ryzyka nawrotu (ROR) zapewnia dodatkową informację prognostyczną dla 10-letniej przeżywalności bez nawrotów przewyższającą standardowe zmienne kliniczne. Ponadto wtórnym celem obu badań była weryfikacja wcześniejszych obserwacji, zgodnie z którymi pacjentki o nowotworze typu luminalny A i luminalny B wykazują istotną statycznie różnicę 10-letniej przeżywalności bez nawrotów. Ponieważ kryteria włączenia i wyniki obu badań były podobne, bazy danych badań połączono i przeanalizowano używając prospektywnie zdefiniowanego planu analiz o takich samych celach, jak poszczególne badania.

Połączona analiza: Wyznaczanie krzywych ryzyka na podstawie połączonych wyników oznaczenia Prosigna z badań TransATAC i ABCSG-8.

Podsumowanie leczenia i charakterystyki klinicznej połączonej analizy zamieszczono poniżej. Schematy poszczególnych badań oraz informacje dotyczące analizy, patrz właściwe sekcje dla badań 1 i 2.

Analiza

Tabela 19: Podsumowanie leczenia i charakterystyki klinicznej w połączonej analizie badań 1 i 2

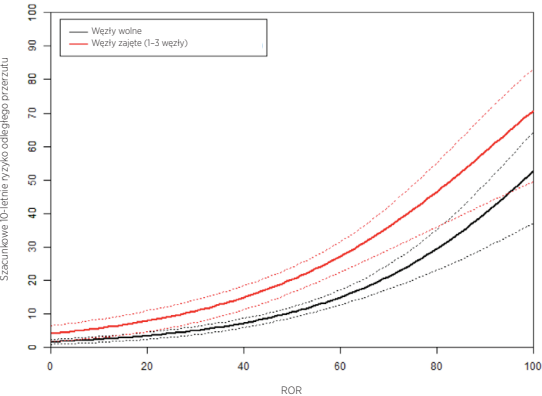
Charakterystyka	Wartość	Węzły wolne (n = 1786)		1-3 zajęte węzły (n = 590)		≥ 4 zajęte węzły (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Leczenie	Anastrozol	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Tylko tamoksyfen	362 (49,0%)	519 (49,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
Stopień	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%)
Wielkość guza	≤ 1 cm	122 (16,5%)	219 (20,9%)	13 (6,2%)	37 (9,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)
	1-2 cm	420 (56,8%)	568 (54,3%)	83 (39,9%)	193 (50,5%)	15 (27,8%)	18 (36,7%)
	2-3 cm	157 (21,2%)	213 (20,3%)	77 (37,0%)	122 (31,9%)	18 (33,3%)	23 (46,9%)
	> 3 cm	40 (5,4%)	47 (4,5%)	35 (16,8%)	30 (7,9%)	18 (33,3%)	6 (12,2%)
Status HER2	Ujemny	649 (87,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	367 (96,1%)	47 (87,0%)	46 (93,9%)
	Dodatni	90 (12,2%)	63 (6,0%)	22 (10,6%)	15 (3,9%)	7 (13,0%)	3 (6,1%)
Przerzuty	Odległe	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Dowolne	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	73 (19,1%)	34 (63,0%)	10 (20,4%)
Podtyp NanoString	Luminal A (Luminalny A)	529 (71,6%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Luminal B (Luminalny B)	176 (23,8%)	284 (27,1%)	68 (32,7%)	118 (30,9%)	20 (37%)	16 (32,7%)
	Basal-like (Basal)	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0)	0 (0)
	HER2-Enriched (Z nadekspresją HER2)	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Oba badania obejmowały grupę leczenia, które polegało na 5 latach przyjmowania tamoksyfenu. W badaniu TransATAC druga grupa badania obejmowała 5 lat przyjmowania anastrozolu, natomiast w badaniu ABCSG-8 druga grupa obejmowała 2 lata tamoksyfenu a następnie 3 lata anastrozolu. Gdy odległe przerzuty (distant recurrence, DR) wymodelowano w funkcji wszystkich zmiennych klinicznych i leczenia, leczenie nie miało znaczącego udziału ($p = 0,66$) jako predyktor DR. Inne główne różnice między badaniami to fakt, że badanie TransATAC obejmowało pacjentki z rakiem stopnia 3, oraz to, że ogólny wskaźnik przerzutów był wyższy w badaniu TransATAC niż w badaniu ABCSG-8.

Wyniki

Rysunek 15 przedstawia 10-letnie ryzyko nawrotów w funkcji wyniku ROR z 95% przedziałami ufności na podstawie osobnych modeli proporcjonalnego hazardu Cox'a dla każdej z grup pacjentek z wolnymi i zajętymi (1-3 zajęte węzły) węzłami chłonnymi.

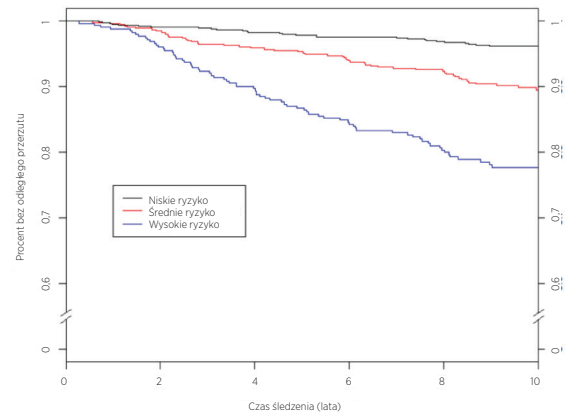
Rysunek 15: dziesięcioletnie szacunkowe ryzyko odległego nawrotu choroby względem stanu węzłów z 95% przedziałami ufności



Rysunek 16 przedstawia wykresy Kaplana-Meiera i częstości względem grup ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami, a rysunek 17 przedstawia te same wykresy dla pacjentek z zajętymi 1-3 węzłami chłonnymi. Na każdym rysunku zamieszczono szczegółowe informacje dotyczące wielkości próby, liczby zdarzeń i szacunkowych wartości procentowych bez odległego nawrotu choroby po 10 latach względem grupy ryzyka. W grupie pacjentek z zajętymi węzłami znajdowało się bardzo niewiele

pacjentek w predefiniowanych grupach niskiego ryzyka, przez co przedział ufności na krzywej Kaplana-Meiera, a tym samym szacunkowa wartość 10-letniej DRFS, była miała bardzo duży rozrzut.

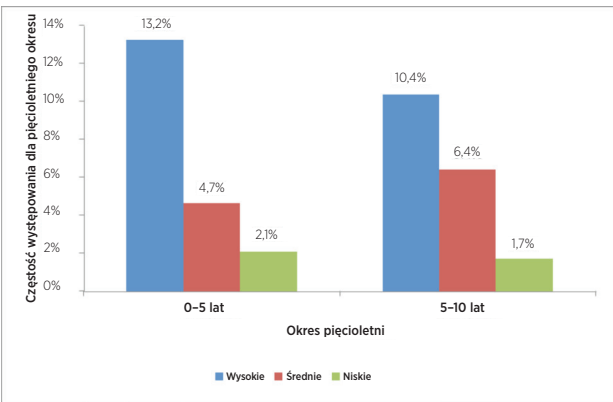
Rysunek 16A: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi



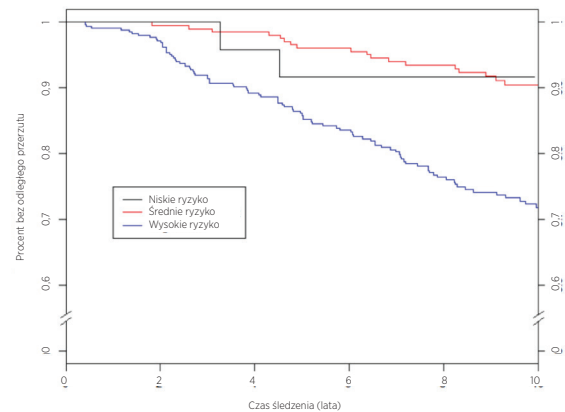
Podsumowanie danych z rysunku 16A: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	875 (49%)	31	96,2% [94,7%-97,3%]
Średnie	551 (31%)	53	89,2% [86,1%-91,7%]
Wysokie	360 (20%)	73	77,7% [72,8%-81,9%]
Razem	1786 (100%)	157	

Rysunek 16B: Częstość występowania względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi w odstępach pięcioletnich



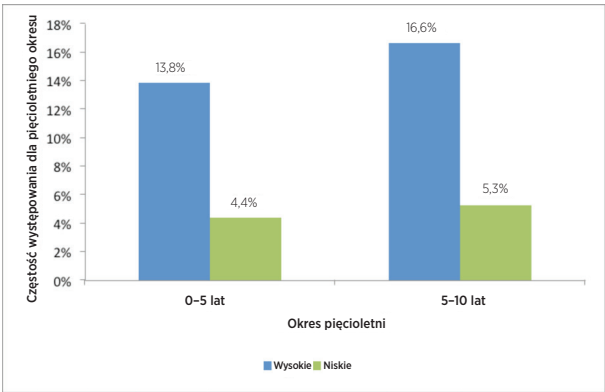
Rysunek 17A: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi od 1 do 3 węzłami chłonnymi



Podsumowanie danych z rysunku 17A: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi od 1 do 3 węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	24 (4%)	2	91,7% [70,6%-97,8%]
Średnie	211 (36%)	18	90,4% [85,2%-93,9%]
Wysokie	355 (60%)	87	71,8% [66,3%-76,6%]
Razem	590 (100%)	107	

Rysunek 17B: Częstość występowania względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) w odstępach pięcioletnich



Na rysunku 17B, ponieważ badanie obejmowało tylko 24 pacjentów z 2 zdarzeniami w grupie niskiego ryzyka z zajętymi węzłami, do celów analizy późnych nawrotów pacjentki zostały połączone z pacjentkami średniego ryzyka.

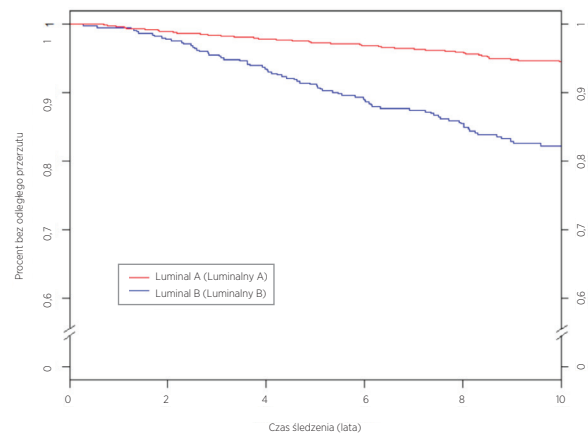
Wszystkie 103 pacjentek w połączonej bazie danych o 4 lub więcej zajętych węzłach chłonnych sklasyfikowano do grupy wysokiego ryzyka. Tabela 20 prezentuje 10-letnie wartości DRFS dla tych pacjentek.

Tabela 20: Wskaźniki dziesięcioletniego DRFS dla pacjentek z 4 lub więcej zajętymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Wysokie	103	39	57,4% [46,3%-67,0%]

U większości uczestniczek połączonych badań (96%) występował nowotwór typu luminalny A lub luminalny B. Rysunek 18 przedstawia porównanie wartości DRFS względem podtypu luminalnego dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi.

Rysunek 18: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

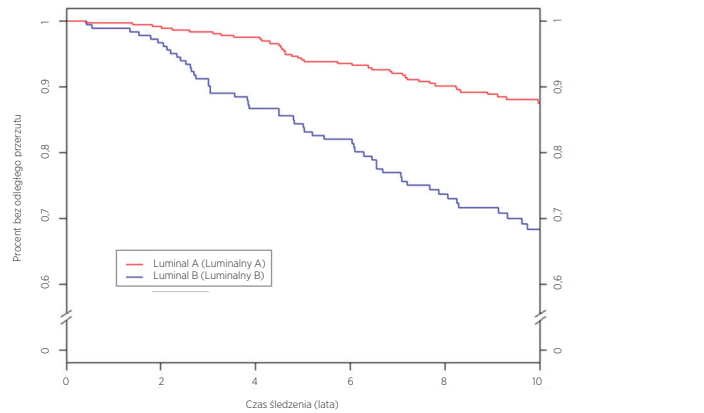


Podsumowanie danych z rysunku 18: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Luminal A (Luminalny A)	1254	62	94,6 [93,1-95,8]
Luminal B (Luminalny B)	460	75	81,9 [77,7-85,3]
Razem	1714	137	

Rysunek 19 przedstawia ten sam wykres dla pacjentek z zajętymi 1–3 węzłami chłonnymi. Dla obu grup stwierdzono znaczące różnice między wartościami DRFS pacjentek z nowotworem typu luminalny A i luminalny B.

Rysunek 19: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z zajętymi 1–3 węzłami chłonnymi



Podsumowanie danych z rysunku 19: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z zajętymi 1–3 węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Luminal A (Luminalny A)	375	41	87,6 [83,5-90,8]
Luminal B (Luminalny B)	186	52	68,3 [60,4-75,0]
Razem	561	93	

W połączonych bazach danych znajdowało się tylko 98 pacjentek podtypu luminalnego z 4 lub więcej zajętymi węzłami chłonnymi. Tabela 21 prezentuje 10-letnie wartości DRFS dla tych pacjentek, które wykazują również znacznie wyższe ryzyko w przypadku typu luminalnego B.

Tabela 21: Wskaźniki dziesięcioletniego DRFS dla pacjentek z 4 lub więcej zajętymi węzłami chłonnymi z podziałem na typ

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Luminal A (Luminalny A)	62	17	68,3 [53,6-79,3]
Luminal B (Luminalny B)	36	20	38,0 [21,4-54,5]
Razem	98	37	

Analiza późnych nawrotów

W opisaney wcześniej połączonej analizie danych częstotliwości zdarzeń w ramach każdej grupy ryzyka nie są stałe w okresie 10 lat, co widać na rysunkach 16B i 17B. Aby lepiej zrozumieć odległe przerzuty w okresie późnych nawrotów, przeprowadzono retrospektywną analizę opisanych powyżej, połączonych danych dla podzbioru pacjentek bez nawrotów w ciągu pięciu lat (łącznie 2163 pacjentek[®]). Z tej grupy 1605 było pacjentkami bez zajętych węzłów chłonnych, a 488 było pacjentkami z zajętymi węzłami (1–3 zajęte węzły). Dla każdej grupy węzła wartości poniżej osi X dla roku 5 na rysunkach 20 i 21 prezentują liczbę narażonych pacjentek po pięciu latach według grupy ryzyka, tj. kwalifikujących się do analizy późnych nawrotów.

Tabela 22 zawiera zestawienie charakterystyki leczenia i klinicznej dla pacjentek bez zajętych i z zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 zajęte węzły) w analizie późnych nawrotów.

Tabela 22: Podsumowanie leczenia i charakterystyki klinicznej w analizie późnych nawrotów

Charakterystyka	Wartość	Węzły wolne (n = 1605)		Węzły zajęte (1–3) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Leczenie	Anastrozol	480	346	153	89
	Tylko tamoksyfen	464	315	158	88
Stopień	Silnie zróżnicowany	192	158	46	36
	Umiarkowanie zróżnicowany	752	394	265	105
	Słabo zróżnicowany	0	109	0	36
Wielkość guza	≤ 1 cm	204	116	35	11
	1–2 cm	526	376	165	74
	2–3 cm	183	139	90	64
	> 3 cm	31	30	21	28
Status HER2	Ujemny	888	590	300	157
	Dodatni	56	71	11	20
Przerzuty	Odległe	41	40	28	29
	Dowolne	71	78	37	37
Podtyp NanoString	Luminal A (Luminalny A)	674	488	218	112
	Luminal B (Luminalny B)	245	150	87	54
	Basal-Like (Basal)	4	5	0	1
	HER2-Enriched (Z nadekspresją HER2)	21	18	6	10

Głównym celem była ocena zdolności wyniku ROR do zapewnienia istotnej dodatkowej informacji prognostycznej dla DRFS przewyższającej standardowe zmienne kliniczne w latach od 5 do 10. Model zerowy obejmujący wyłącznie CTS porównano z modelem alternatywnym obejmującym CTS i ROR stosując test stosunku wiarygodności (likelihood ratio, LR). Parametr ROR dodawał istotną statystycznie informacje dla DRFS powyżej 5 lat przewyższającą standardowe zmienne kliniczne dla wszystkich pacjentek (p < 0,0001) oraz dla pacjentek z wolnymi (p < 0,0001) i z zajętymi węzłami (1–3 zajęte węzły) (p < 0,0001).

Tabela 23 zawiera zestawienie stosunków hazardu dla 10-punktowej zmiany na podstawie analizy jednej zmiennej i analizy wielu zmiennych obejmującej wynik ROR i CTS. Wszystkie stosunki hazardu dla wyniku ROR są istotnie różne od 1 nawet po skorygowaniu dla CTS. W tabeli 22 zamieszczono także współczynniki kontyngencji C. Dla obu grup współczynnik kontyngencji C był znacząco różny od wartości 0,5, bez wartości informacyjnej.

Tabela 23: Podsumowanie testów późnych nawrotów

Liczba zajętych węzłów	N	Stosunek hazardu: Zmiana 10-punktowego wyniku ROR		Współczynnik C z 95% przedziałami ufności		
		Analiza jednej zmiennej	Analiza wielu zmiennych	Współczynnik C	Dolna	Górna
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%

Większość pacjentek w obu badaniach nie wykazywała nadekspresji HER2. Tabela 24 prezentuje rozkład statusu HER2 dla pacjentek z wolnymi i zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 węzły). W obu grupach ponad 90% kobiet uczestniczących w badaniu nie wykazywało nadekspresji HER2.

Tabela 24: Rozkład statusu HER2 według liczby zajętych węzłów

Podzbiór pacjentek	Status HER2		Razem
	Ujemny	Dodatni	
Pacjentki z wolnymi węzłami	1 478 (92,1%)	127 (7,9%)	1 605
Pacjentki z zajętymi węzłami 1–3 zajęte węzły	457 (93,6%)	31 (6,4%)	488

Tabela 25 przedstawia porównanie modelu wielu zmiennych dopasowanego do wszystkich pacjentek w danej grupie węzłów oraz modelu dopasowanego do wszystkich pacjentek bez nadekspresji HER2 w grupie. Brak różnic istotnych statystycznie.

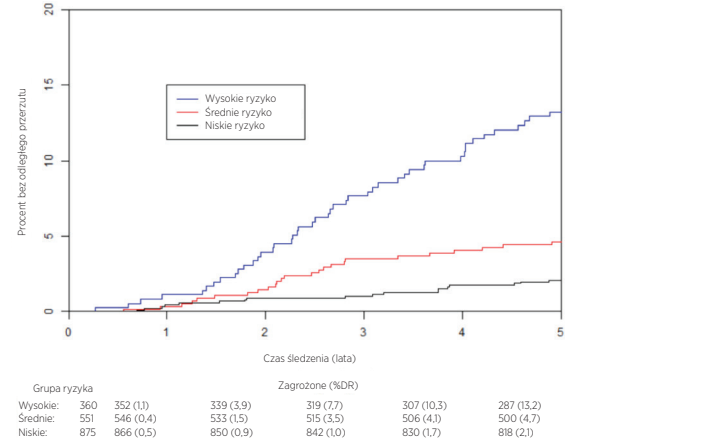
Tabela 25: Stosunki hazardu dla zmiany 10-punktowego wyniku ROR: wszystkie pacjentki w podgrupie względem pacjentek bez nadekspresji HER2 w ramach podgrupy

Liczba zajętych węzłów	Wszystkie pacjentki [95% CI]	Pacjentki bez nadekspresji HER2 [95% CI]
Pacjentki z wolnymi węzłami	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Pacjentki z zajętymi węzłami 1-3 zajęte węzły	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Porównanie między grupami ryzyka jest analizowane dalej na rysunkach 20 i 21, które prezentują krzywe częstości występowania dla wczesnych i późnych nawrotów, z podziałem na grupy ryzyka dla pacjentek, odpowiednio, z wolnymi i zajętymi (1-3) węzłami. Krzywe częstości występowania obejmują okres wczesnych przerzutów (w ciągu pierwszych 5 lat) i okres późnych przerzutów (między 5 a 10 lat po rozpoznaniu). Pod osią X na każdym z rysunków podano liczbę zagrożonych kobiet i skumulowaną częstość występowania. Tabele zestawień prezentują przedziały ufności dla skumulowanej częstości nawrotów przy 5 lub 10 latach dla kobiet bez nawrotów po zakończeniu 5 lat leczenia. Dla pacjentek z węzłami zajętymi (1-3 węzły) ujętych na rysunku 21, połączono grupy niskiego i średniego ryzyka, ze względu na małą liczbę pacjentek w grupie niskiego ryzyka.

Populacja niskiego ryzyka charakteryzuje się małym prawdopodobieństwem odległego nawrotu choroby między latami 5 a 10 po 5 latach terapii hormonalnej, czego dowodzą krzywe skumulowanej częstości występowania i związane z nimi stosunki hazardu dla każdej grupy ryzyka. Dla kontrastu dla populacji średniego i wysokiego ryzyka utrzymuje się ryzyko późnego odległego nawrotu choroby po 5 latach terapii hormonalnej. Różnica w wynikach między populacjami średniego i wysokiego ryzyka pacjentek z węzłami wolnymi zostaje ustalona w ciągu pierwszych 5 lat (wskaźnik nawrotów = 13,2% [9,6%-16,7%] dla pacjentek wysokiego ryzyka i 4,7% [2,9%-6,4%] dla pacjentek średniego ryzyka) i utrzymuje się do 10 lat, jednak wskaźniki nawrotów dla grup średniego i wysokiego ryzyka po 5 latach terapii hormonalnej są bardzo podobne.

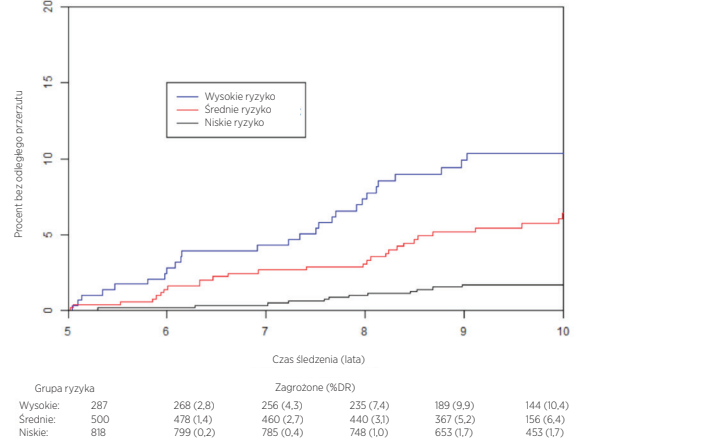
Rysunek 20A: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 0-5 lat: Pacjentki z wolnymi węzłami



Podsumowanie danych z rysunku 20A: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 0-5 lat: Pacjentki z wolnymi węzłami

Wskaźniki nawrotów według grupy ryzyka do pięciu lat po zakończeniu leczenia [95% przedziały ufności]		
Wysokie	Średnie	Niskie
13,2% [9,6%-16,7%]	4,7% [2,9%-6,4%]	2,1% [1,1%-3,1%]

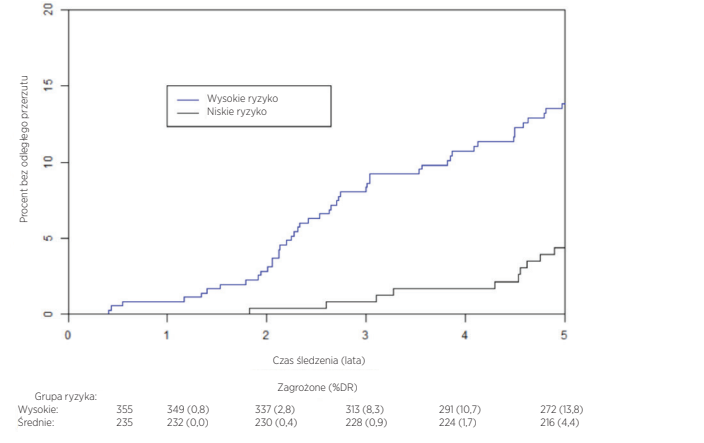
Rysunek 20B: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 5-10 lat: Pacjentki z wolnymi węzłami



Podsumowanie danych z rysunku 20B: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 5-10 lat: Pacjentki z wolnymi węzłami

Wskaźniki nawrotów według grupy ryzyka po wolnym od nawrotów zakończeniu leczenia [95% przedziały ufności]		
Wysokie	Średnie	Niskie
10,4% [6,6%-14%]	6,4% [4,1%-8,7%]	1,7% [0,8%-2,6%]

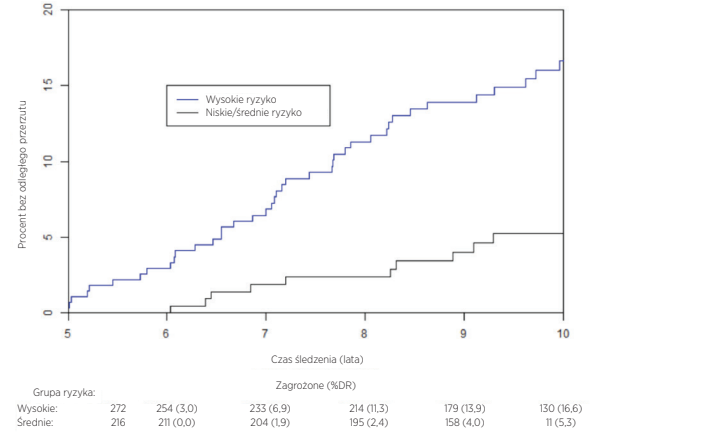
Rysunek 21A: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 0-5 lat: Pacjentki z węzłami zajętymi (1-3 węzły)



Podsumowanie danych z rysunku 21A: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 0-5 lat: Pacjentki z węzłami zajętymi (1-3 węzły)

Wskaźniki nawrotów według grupy ryzyka do pięciu lat po zakończeniu leczenia [95% przedziały ufności]	
Wysokie	Niskie/średnie
13,8% [10,1%-17,4%]	4,4% [1,7%-7,0%]

Rysunek 21B: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 5-10 lat: Pacjentki z węzłami zajętymi (1-3 węzły)



Podsumowanie danych z rysunku 21B: Krzywe częstości występowania dla odległego nawrotu choroby względem grup ryzyka w okresie 5–10 lat: Pacjentki z węzłami zajęzłymi (1–3 węzły)

Wskaźniki nawrotów według grupy ryzyka po wolnym od nawrotów zakończeniu leczenia [95% przedziału ufności]	
Wysokie	Niskie/średnie
16,6% [11,7%–21,3%]	5,3% [2,0%–8,4%]

Wnioski z połączonej analizy

W połączonym badaniu dla pacjentek bez nawrotów przez pięć lat wykazano, że wynik ROR dodaje istotne informacje prognostyczne w okresie późnych nawrotów między 5 a 10 lat po rozpoznaniu, przewyższające standardowe zmienne kliniczne. Przy zastosowaniu grup ryzyka zdefiniowanych w punkcie wyjściowym dla każdej z grup swoistych dla liczby zajęzłych węzłłów wykazano, że grupy ryzyka klasyfikują pełny zestaw pacjentek na grupy o istotnie różnym ryzyku późnego odległego nawrotu choroby. Zarówno analiza ciągła, jak i na podstawie grup ryzyka na bazie wyniku ROR, wykazała podobną informację prognostyczną w różnych podgrupach. Nie stwierdzono ważnej różnicy między wynikami dla pacjentek bez nadekspresji HER2 w porównaniu ze wszystkimi pacjentkami.

W badaniach TransATAC i ABCSG-8 wykazano, że wartość ROR dodaje znaczącą informację prognostyczną przewyższającą standardowe zmienne kliniczne i leczenia, zarówno przy uwzględnieniu jako miara ciągła, jak i przy zastosowaniu trzech predefiniowanych grup ryzyka. Badania wykazywały różne profile ryzyka w takim znaczeniu, że częstość zdarzeń była wyższa w badaniu TransATAC niż w badaniu ABCSG-8: jest to oczywiste po porównaniu wartości DRFS (%) w grupach kontrolnych badań ATAC (90,8%) i ABCSG8 (92,5%) podanych w literaturze^{9,10}. Analiza ta łączyła dane z tych dwóch badań z równymi wagami, aby wygenerować profile ryzyka, które – jak się oczekuje – będzie można uogólnić na inne populacje pacjentów niż tylko wyniki poszczególnych badań.

Badanie 1: Przewidywanie ryzyka nawrotów u kobiet po menopauzie z wolnymi lub zajęzłymi węzłłami chłłonnymi, z rakiem sutka wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium, leczonych lekiem arimidex lub tamoksyfemem: badanie TransATAC.

Schemat badania

Kliniczne badanie weryfikacyjne zaprojektowano w celu weryfikacji czy wynik ryzyka nawrotu (ROR) zapewnia dodatkową informację prognostyczną dla przeżywalności bez nawrotów (DRFS) przewyższającą standardowe zmienne kliniczne przy użyciu wszystkich dostępnych próbek pacjentek. W badaniu tym wykorzystano RNA wyizolowane z tkanki FFPE raka sutka z podzbioru pacjentek uczestniczących w badaniu ATAC¹¹. Badanie ATAC obejmowało 9366 pacjentek w trzech grupach badania (1:1:1). Pacjentki zostały zrandomizowane do otrzymywania przez 5 lat leczenia hormonalnego w postaci 1 mg anastrozolu (tj. arimidex) plus placebo tamoksyfenu, 20 mg tamoksyfenu plus placebo anastrozolu lub tamoksyfenu i arimidexu w skojarzeniu. Leczenie w grupie skojarzonej przerwano po analizie początkowej, ponieważ nie wykazano korzyści w zakresie skuteczności lub tolerancji w stosunku do monoterapii tamoksyfemem. Opublikowano ostatnio medianę kontroli po 10 latach grup monoterapii w badaniu ATAC, zgodnie z wymogami FDA w zakresie aktualizacji informacji dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności⁹. Dla pacjentek z rakiem wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych zaobserwowano znaczącą poprawę wartości DFS (współczynnik ryzyka, HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) i DRFS (HR = 0,85) dla pacjentek leczonych anastrozolem w porównaniu do leczonych tamoksyfemem w tej samej analizie. Różnice bezwzględne w przeżywalności bez nawrotów między anastrozolem i tamoksyfemem zwiększyły się w czasie z 2,7% po 5 latach do 4,3% po 10 latach. Projekt TransATAC rozpoczęto w roku 2002 w ramach protokołu TA/01, w celu retrospektywnego ustanowienia banku próbek z archiwalnych histopatologicznych bloczków FFPE od pacjentek ATAC¹¹.

Uzyskano łącznie 2006 bloczków podchodzących od 4160 kobiet z rakiem sutka z ekspresją receptorów hormonalnych, które zostały zrandomizowane do grup monoterapii badania ATAC. Z wymienionych bloczków FFPE 1372 zebrano od pacjentek w Wielkiej Brytanii i zawierały one dostateczną ilość inwazyjnego nowotworu do analizy za pomocą testu Genomic Health® Oncotype Dx^{®12}. Wynik nawrotów Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) określono na podstawie bloczków FFPE, a wyniki badania zweryfikowały klinicznie wartość RS w ocenie przeżywalności bez nawrotów u pacjentek po menopauzie, z rakiem sutka wykazujących ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium leczonych anastrozolem lub tamoksyfemem. RNA pozostałe z badania Oncotype Dx zostało przesłane do szpitala Royal Marsden Hospital w Londynie, gdzie przechowywano je w temperaturze -70°C. Łącznie dla 1017 pacjentek z badania Oncotype Dx pozostało > 500 ng RNA, które zostało przebadane przez firmę NanoString w ramach klinicznego badania weryfikacyjnego NanoString.

W badaniu tym wykorzystano podtypy wewnętrzne wygenerowane przez oznaczenia i oceniono dwie wersje wyniku ROR, używając predefiniowanego podejścia sekwencyjnego. Dwa wyniki ROR, z których każdy charakteryzował się zakresem od 0 do 100 zostały wyliczone z użyciem 50 genów testowych, zgodnie z wcześniejszą publikacją², lub podzbioru 46 genów. W każdym przypadku współczynniki wyliczono z modelu Cox'a, obejmującego korelację Pearsona zbioru 50 lub 46 genów używanego do obliczenia podtypu, wyniku proliferacji i wielkości guza. Wszystkie analizy przeprowadzono z użyciem danych kontroli po 10 latach.

Głównym punktem końcowym było przeżycie bez nawrotów (distant recurrence-free survival, DRFS). Wartość tę zdefiniowano jako odstęp czasowy od rozpoznania do odległego nawrotu choroby lub zgonu z powodu raka sutka. Wtórny punktem końcowym było przeżycie bez nawrotów (recurrence-free survival, RFS). Wartość tę zdefiniowano jako odstęp czasowy od rozpoznania do pierwszego nawrotu (miejscowego, regionalnego lub odległego nawrotu choroby) lub zgonu z powodu raka sutka.

Przy wykorzystaniu dostępnych próbek pacjentek dopasowano modele wielowymiarowego zagrożenia proporcjonalnego (proportional hazards, PH) Cox'a w celu oceny głównego celu testów sekwencyjnych ROR na podstawie 50 i 46 genów. Model obejmował standardowe kliniczne zmienne towarzyszące (wiek, stopień nowotworu, stan węzłłów, leczenie wspomagające). Następnie dopasowano model Cox'a i użyto testu stosunku wiarygodności do sprawdzenia, czy wartość ROR dodawała istotną statystycznie ($\alpha = 0,05$) dodatkową informację prognostyczną przewyższającą dostępne w klasyfikacji leczenia klinicznego (Clinical Treatment Score, CTS). CTS to zoptymalizowana kombinacja czynników kliniczno-patologicznych, stworzona przez badacza klinicznego jako miara standardu patologii¹². Główne analizy zostały powtórzone dla różnych podzbiorów pacjentek (wszystkie, z wolnymi węzłłami, z zajęzłymi węzłłami lub tylko bez nadekspresji HER2) i punktami końcowymi (DRFS lub RFS).

Dla każdej z grup pacjentek z wolnymi i zajęzłymi węzłłami chłłonnymi użyto modeli Cox'a (wyłączając CTS) do przewidzenia 10-letniego ryzyka nawrotów w funkcji wyniku ROR. W oparciu o przewidywania modeli zdefiniowano trzy grupy ryzyka:

Niskie ryzyko:	< 10% prawdopodobieństwa DR w ciągu 10 lat.
Średnie ryzyko:	10–20% prawdopodobieństwa DR w ciągu 10 lat.
Wysokie ryzyko:	>20% prawdopodobieństwa DR w ciągu 10 lat.

Analiza

Dla każdej grupy ryzyka wykreślono krzywe Kaplan-Meiera. Przeprowadzono testy stosunku wiarygodności (używanego do porównania dopasowania dwóch modeli statystycznych) zgodnie z opisem w analizie głównej dla testów Genomic Health's Oncotype Dx (wynik nawrotu, Recurrence Score, RS) oraz testu głównego badacza na podstawie wyników immunochemicznych (IHC4). Wyniki te porównano z wynikami uzyskanymi dla ROR w celu określenia zakresu, w jakim każdy z systemów oceny zapewnienia dodatkowe informacje prognostyczne przewyższające CTS. Wyniki IHC4 nie będą dalej omawiane, ponieważ trudno je porównać z innymi oznaczeniami, jako że test IHC4 został opracowany na podstawie danych z badania TransATAC.

Tabela 26: Podsumowanie danych demograficznych i charakterystyki klinicznej

Charakterystyka	Bieżący badanie (n = 1007)		Pierwotne badanie, z którego uzyskano RNA (n = 1231)	Nieuwzględnione grupy jednego czynnika z badania ATAC (n = 2929)
	Liczba pacjentek	% pacjentek		
Stan węzłów				
Ujemny	701	70%	71%	68%
Dodatni	268	27%	25%	25%
Nieznany	38	4%	4%	7%
Wielkość guza				
≤ 1 cm	138	14%	67%	70%
1–2 cm	523	52%		
2–3 cm	253	25%	33%	30%
> 3 cm	93	9%		
Stopień guza				
Silnie zróżnicowany	213	21%	27%	25%
Umiarkowanie zróżnicowany	601	60%	57%	59%
Słabo zróżnicowany	193	19%	16%	17%
Wiek				
Średnia	64,4 lat		64,3	66,1

Tabela 27: Dodatkowa charakterystyka kliniczna

Charakterystyka	Liczba pacjentek	Procent pacjentek
Podtyp		
Basal-Like (Basal)	9	1%
HER2-Enriched (Z nadekspresją HER2)	41	4%
Luminal A (Luminalny A)	692	69%
Luminal B (Luminalny B)	265	26%
Leczenie		
Anastrozol	513	51%
Tamoksyfem	494	49%
Przerzuty		
Dowolne	210	21%
Odległe	160	16%
Status HER2		
Ujemny	888	88%
Dodatni	119	12%

Wyniki

Testy analizy pierwotnej wykazały, że wynik ROR zapewnia dodatkowe informacje prognostyczne dla przeżycia bez nawrotów przewyższające standardowe zmienne kliniczne (CTS). Wszystkie przedstawione poniżej dane ROR dotyczą 46 genów, jako że jest to podstawa wyniku ROR zgłaszanego przez oznaczenie Prosigna.

Tabela 28: Testy analizy pierwotnej ROR

Model zerowy	Model alternatywny	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 wartość p
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

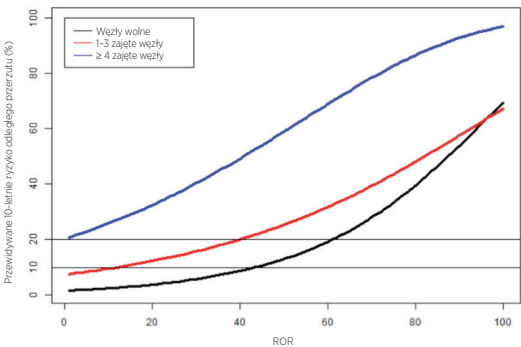
Analiza wtórna wykazała, że wartość ROR jest w sposób istotny powiązana z przeżyciem bez nawrotów i dodaje informacje prognostyczne przewyższające CTS w wielu znaczących klinicznie podgrupach.

Tabela 29: Powtórzenie testów analizy pierwotnej dla predefiniowanych podgrup

Grupa pacjentek	Punkt końcowy	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń	CTS+ROR vs CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 wartość p
Wszystkie	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
Bez nadekspresji HER2	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Węzły wolne	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Węzły zajęte	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
Bez nadekspresji HER2, węzły wolne	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

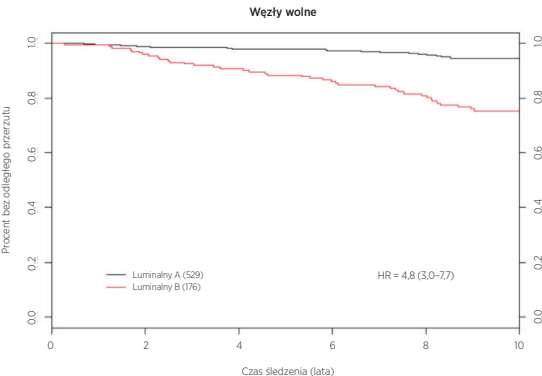
Analiza pierwotna i wtórna wykazały, że wartość ROR była w sposób ciągły powiązana z DRFS dla wszystkich pacjentek i we wszystkich podgrupach.

Rysunek 22: Przewidywane dziesięcioletnie ryzyko odległego nawrotu choroby szacowane na podstawie wyniku ROR w ramach grupy stanu węzłów

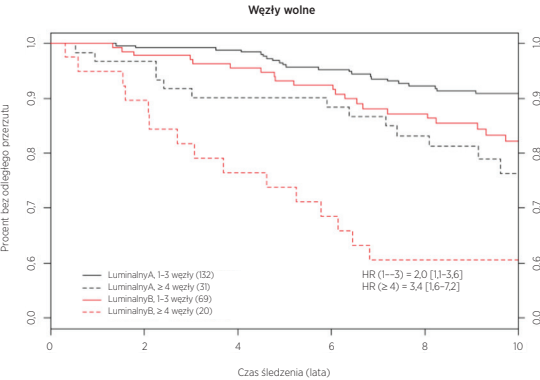


Analiza wtórna wykazała, że podtypy luminalny A i luminalny B wykazują istotne statystycznie, różne wyniki w każdej z podgrup pacjentek zdefiniowanych na podstawie stanu węzłów.

Rysunek 23: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi względem podtypu

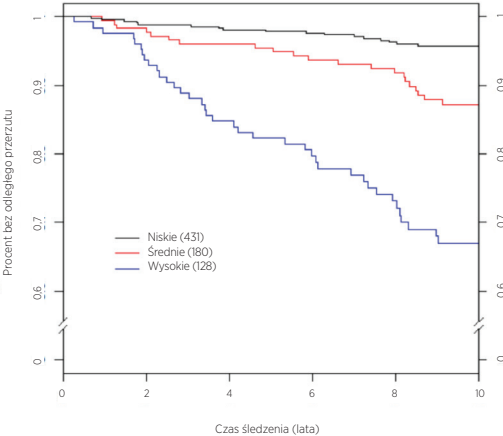


Rysunek 24: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi względem podtypu



Rysunki 25 i 26 ilustrują fakt, że w ramach każdej kategorii węzłów bezwzględne ryzyko kliniczne dla tych pacjentek, dla których przewidziano niskie ryzyko było znacząco różne od bezwzględnego ryzyka klinicznego pacjentek, dla których przewidziano wysokie ryzyko; pacjentki należące według przewidywania do grupy niskiego ryzyka wykazały wskaźnik 10-letnich DR niższe od 10%, podczas gdy u pacjentek, dla których przewidziano wysokie ryzyko zaobserwowano wskaźnik 10-letnich DR powyżej 30%.

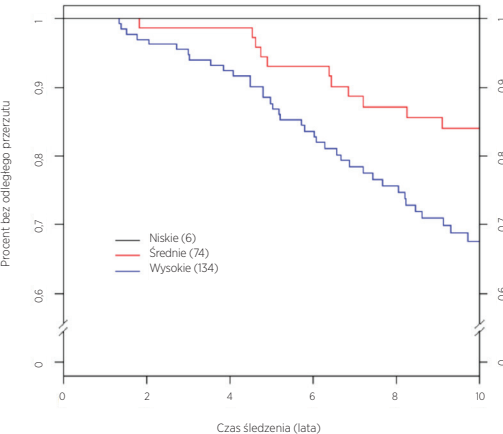
Rysunek 25: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi z wykluczeniem CTS



Podsumowanie danych z rysunku 25: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi z wykluczeniem CTS

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	431 (58%)	17	96% [94%-98%]
Średnie	180 (24%)	22	86% [81%-92%]
Wysokie	128 (17%)	38	67% [59%-76%]
Razem	739 (100%)	77	

Rysunek 26: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi od 1 do 3 węzłami chłonnymi, bez CTS



Podsumowanie danych z rysunku 26: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajęzłmł od 1 do 3 wężłami chłonnymi, bez CTS

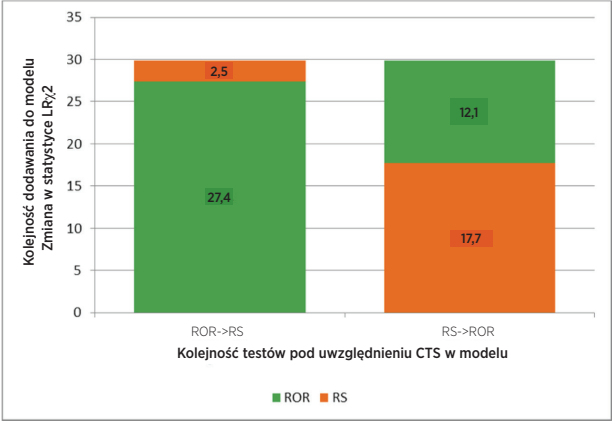
Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	6 (3%)	0	100% [N/D]
Średnie	74 (35%)	11	84% [76%-93%]
Wysokie	134 (63%)	38	68% [59%-77%]
Razem	214 (100%)	49	

Porównanie ROR z RS

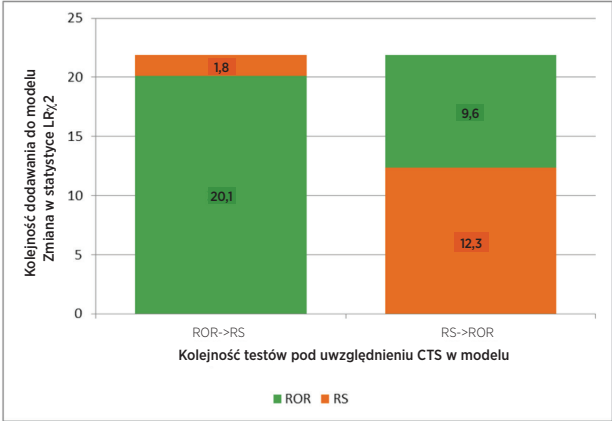
Z 1007 próbek z wynikami ROR, wyniki testu Oncotype Dx były dostępne dla wszystkich 1007 próbek, jednak wyniki IHC tylko dla 940 próbek. Aby umożliwić porównanie wszystkich trzech testów, wyniki opisane w tej części dotyczą tylko 940 próbek, dla których istniały wyniki wszystkich trzech metod (jednak nie jest tu omawiana metoda IHC4). Przetawiono testy stosunku wiarygodności dla dodania pojedynczej zmiennej, a więc aby dodana informacja była istotna statystycznie ($\chi^2 = 0,05$), zmiana χ^2 na 1 stopień swobody musi być większa od 3,84. Wykresy poniżej prezentują dodaną informację po dodaniu testu prognostycznego do wyników innego testu prognostycznego plus CTS w kolejności. Przy każdym dodaniu wzrost informacji mierzony jest przez zmianę χ^2 .

ROR dodane do RS oprócz CTS: informacje prognostyczne

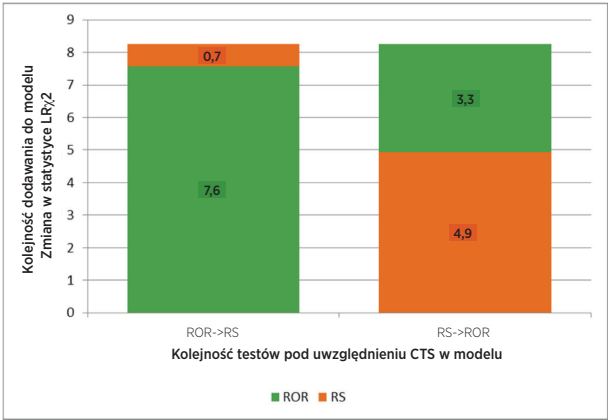
Rysunek 27: Informacje prognostyczne dla DRFS poza CTS dla wszystkich pacjentek (n = 940)



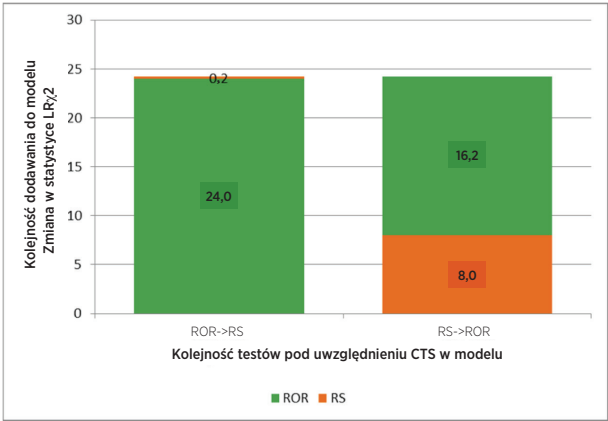
Rysunek 28: Informacje prognostyczne dla DRFS poza CTS dla pacjentek z wolnymi wężłami (n = 683)



Rysunek 29: Informacje prognostyczne dla DRFS poza CTS dla pacjentek z zajęzłmł wężłami (n = 257)



Rysunek 30: Informacje prognostyczne dla DRFS poza CTS dla pacjentek z wolnymi wężłami bez nadekspresji HER2 (n = 649)



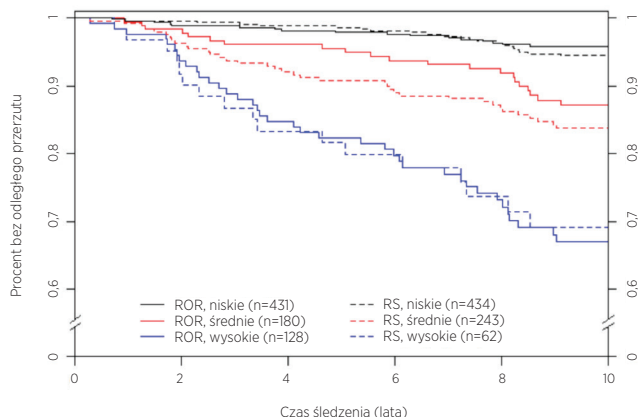
Rysunki od 27 do 30 prezentują informację dodaną poza CTS po sekwencyjnym dodaniu dwóch testów prognostycznych. Przy każdym dodaniu wzrost informacji mierzony jest przez zmianę wartości χ^2 . Na przykład gdy ROR było pierwszym testem dodanym po włączeniu CTS (dane wszystkich pacjentek), zmiana wartości χ^2 wyniosła 27,4. Z CTS i ROR w modelu, dodanie RS doprowadziło do zmiany wartości χ^2 wynoszącej 2,5, co nie jest istotne (wartość krytyczna dla testu χ^2 z 1 stopniem swobody wynosi 3,84): oznacza to, że po uwzględnieniu w modelu CTS i ROR parametr RS nie dodaje znaczącej informacji. Jednakże jeśli najpierw zostanie dodany test RS, w teście ROR nadal zawarta jest informacja nieuwzględniona w kombinacji CTS i RS. Oba testy wykazują istotność prognostyczną po dodaniu do CTS u pacjentek z zajęzłmł wężłami, jednak żaden z nich nie wykazuje istotności jako drugi dodany test, być może z powodu mniejszej liczbeości próby. Dla podzbioru pacjentek bez zajęzłmł wężłów i bez nadekspresji HER2 RS nie dodaje znaczącej informacji prognostycznej do kombinacji CTS + ROR. Z drugiej strony ROR dodaje znaczącą informację prognostyczną do CTS + RS.

ROR względem RS: wyniki grup ryzyka

W celu porównania tego, jak te dwa testy dzieliły pacjentki pod względem ryzyka, zdefiniowano grupy ryzyka na podstawie szacunku każdego testu ryzyka odległego nawrotu choroby po 10 latach w populacji TransATAC. Progi wyników ryzyka do zdefiniowania grup ryzyka wybrano dla każdego testu na podstawie wyników naszego badania TransATAC w celu zdefiniowania grup ryzyka zawierających pacjentki o tym samym ryzyku. W celu osiągnięcia tych porównywalnych grup ryzyka punkty odcięcia użyte w teście Oncotype DX był inne, niż zastosowane w teście Genomic Health. Dla każdego testu grupa niskiego ryzyka została prospektywnie zdefiniowana jako pacjentki o ryzyku nawrotu niższym od 10%. Dla każdego testu grupa średniego ryzyka została prospektywnie zdefiniowana jako pacjentki o ryzyku nawrotu od 10% do 20%. Dla każdego testu grupa wysokiego ryzyka została prospektywnie zdefiniowana jako pacjentki o ryzyku nawrotu wyższym od 20%. Wielkości i wyniki grup ryzyka zdefiniowane dla każdego z testów przedstawiono na rysunku.

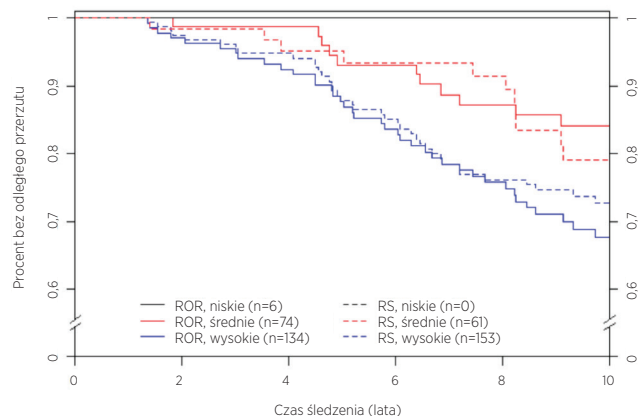
Rysunek 31 ilustruje fakt, że test Prosigna przydzielił 26% mniej pacjentek do grupy średniego ryzyka niż test Oncotype DX (180 względem 243 pacjentek). Ponadto test Prosigna przydzielił do grupy wysokiego ryzyka więcej pacjentek, niż test Oncotype DX, jednak grupy niskiego i wysokiego ryzyka zdefiniowane dla każdego z testów mają podobne wyniki, co ilustrują nakładające się krzywe Kaplana-Meiera. Obserwacja ta doprowadziła niezależnych badaczy z naszego badania TransATAC do wniosku, że test Prosigna przydzielał do grupy średniego ryzyka mniej pacjentek, niż test Oncotype DX RS przy równoważnym lub wyższym oddzieleniu między grupami niskiego i wysokiego ryzyka.

Rysunek 31: Wynik ROR testu Prosigna identyfikował znacząco więcej pacjentek o wysokim stopniu ryzyka i mniej pacjentek o średnim stopniu ryzyka, niż wynik RS testu Oncotype DX dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi.



Przy zastosowaniu wyłącznie ROR dla pacjentek z zajęтыми węzłami chłonnymi (1-3 zajęte węzły), dla 6 pacjentek przewidziano ryzyko odległego nawrotu choroby < 10%. U żadnej z tych pacjentek w trakcie trwania badania nie wystąpiły zdarzenia. Jedna z pacjentek była obserwowana przez 7,9 lat, a u wszystkich pozostałych nie wystąpił odległy przerzut przez przynajmniej 9,9 lat obserwacji co wskazuje, że pacjentki z zajęтыми węzłami, dla których przewidziano niskie ryzyko, faktycznie były narażone na niskie ryzyko. Do porównania nie zostały wykorzystane testy logarytmiczne rang, ponieważ w przypadku RS nie stwierdzono grupy niskiego ryzyka.

Rysunek 32: Porównanie klasyfikacji grup 10-letniej DRFS bez użycia CTS: pacjentki z zajęтыми węzłami (1-3 zajęte węzły) (ROR vs RS)



Wnioski badania klinicznego 1

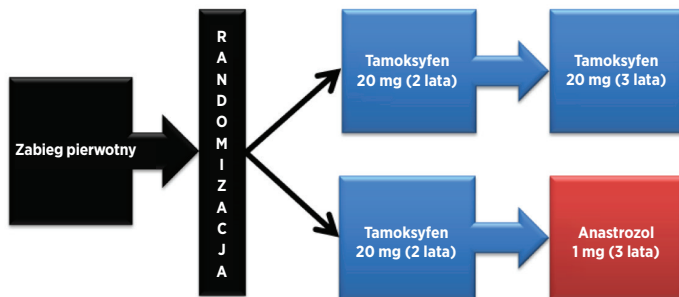
Analiza pierwotna wykazała, że ROR dodaje znaczącą informację prognostyczną przewyższającą standardowe kliniczne zmienne towarzyszące (standard clinical covariates, CTS) u wszystkich pacjentek i we wszystkich predefiniowanych, istotnych klinicznie podgrupach. Wykazano, że ROR dzieli pacjentki na 3 grupy ryzyka o istotnych statystycznie różnicach wyników dla pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych. Wykazano, że podtypy wewnętrzne luminalny A i luminalny B charakteryzują się znacząco różnymi wartościami DRFS i RFS, niezależnie od stanu węzłów. W porównaniu ze wskaźnikiem prognostycznym RS (21-genowy wynik nawrotów z testu Oncotype Dx), wartość ROR zapewniała dodatkową wartość prognostyczną przewyższającą RS u wszystkich pacjentek i w istotnych klinicznie podgrupach. Co więcej, w grupie z węzłami wolnymi wartość ROR podwajała liczbę pacjentek przypisanych do grupy wysokiego ryzyka i znacząco ograniczyła liczbę pacjentek przypisanych do grupy średniego ryzyka bez zmniejszania różnic w wynikach między grupą niskiego i wysokiego ryzyka w porównaniu z RS.

Badanie 2: Prognoza dla pacjentek po menopauzie z rakiem wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych otrzymujących wyłącznie układową wspomagającą terapię hormonalną z użyciem oznaczenia Prosigna: badanie ABCSG-8

Schemat badania

Grupa badania obejmowała próbki tkanki FFPE raka sutka zebrane retrospektywnie i zarchiwizowane w banku ABCSG od pacjentek przyjętych do badania ABCSG-8 od 1996 do 2004 roku¹³. Łącznie 3901 kobiet po menopauzie z rakiem sutka wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych we wczesnym stadium zrandomizowano przed leczeniem do dwuletniego leczenia wspomagającego Tamoksyfenem, po którym następowało trzyletnie leczenie lekiem Arimidex® (anastrozol) lub do pięcioletniego leczenia wspomagającego Tamoksyfenem. Struktura leczenia w badaniu została przedstawiona na rysunku 33.

Rysunek 33: Ilustracja schematu badania ABCSG-8



Grupa weryfikacyjna reprezentuje część dostępnej do oceny grupy ABCSG-8, dla której możliwe było retrospektywne zebranie materiałów tkankowych z banku ABCSG i dla których możliwe było uzyskanie świadomej zgody, lub pacjentka zmarła. Pacjentki spełniające kryteria włączenia do oryginalnego badania były wykluczone tylko w przypadku, gdy tkanka była niedostępna do wykonania oznaczenia NanoString lub niemożliwe było uzyskanie zgody pacjentki. W ramach badania przetestowano wszystkie próbki z blokiem nowotworu i zgodą pacjentki.

W badaniu tym wykorzystano podtypy wewnętrzne wygenerowane przez oznaczenia i oceniono wynik ROR używając predefiniowanego planu analizy. Wynik ROR o zakresie od 0 do 100 został wyliczony z użyciem podzbioru 46 genów z wcześniej opublikowanego zbioru 50 genów². Współczynniki ROR wyliczono z modelu Cox'a, obejmującego korelację Pearsona zbioru 46 genów używanych do określenia podtypu wewnętrznego, wyniku proliferacji i wielkości guza. Wszystkie analizy przeprowadzono z użyciem danych kontroli po maksymalnym czasie.

Głównym punktem końcowym było przeżycie bez nawrotów (distant recurrence-free survival, DRFS). Wartość tę zdefiniowano jako odstęp czasowy od rozpoznania do odległego nawrotu choroby lub zgonu z powodu raka sutka. Wtórny punktem końcowym było przeżycie bez nawrotów (recurrence-free survival, RFS). Wartość tę zdefiniowano jako odstęp czasowy od rozpoznania do pierwszego nawrotu (miejscowego, regionalnego lub odległego nawrotu choroby) lub zgonu z powodu raka sutka.

Przy wykorzystaniu dostępnych próbek pacjentek dopasowano modele wielowymiarowego zagrożenia proporcjonalnego (proportional hazards, PH) Cox'a w celu oceny głównego celu testów sekwencyjnych ROR. Model obejmował standardowe kliniczne zmienne towarzyszące (wiek, stopień nowotworu, stan węzłów, leczenie wspomagające). Następnie dopasowano model Cox'a i użyciu testu stosunku wiarygodności do sprawdzenia, czy wartość ROR dodawała istotną statystycznie ($\alpha = 0,05$) dodatkową informację prognostyczną przewyższającą dostępne w klasyfikacji leczenia klinicznego (Clinical Treatment Score, CTS). CTS to zoptymalizowana kombinacja czynników kliniczno-patologicznych, stworzona jako miara standardu patologii¹². Główne analizy zostały powtórzone dla różnych podzbiorów pacjentek (wszystkie, z wolnymi węzłami, z zajęтыми węzłami lub tylko bez nadekspresji HER2) i punktami końcowymi (DRFS lub RFS).

Analiza

Zastosowano podejście sekwencyjne, w którym głównym celem naukowym było wykazanie, że ROR dodaje istotną informację prognostyczną przewyższającą standardowe zmienne kliniczne. Główny cel dodał ponadto wymaganie wykazania, że kategorierna klasyfikacja ryzyka przez przypisanie do jednej z trzech grup (niskie/średnie/wysokie) dodaje istotną informację prognostyczną przewyższającą standardowe zmienne kliniczne. W celu spełnienia tego wymagania konieczne było wykazanie obu z następujących warunków:

- Wykazanie, że ciągły wynik ROR zwiększa wartość prognostyczną, przewyższając standardowe zmienne kliniczne.
- W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej o braku informacji prognostycznych wykazanie, że kategorie ryzyka na podstawie ROR zwiększają wartość prognostyczną, przewyższając standardowe zmienne kliniczne.

Przy wykorzystaniu dostępnych próbek pacjentek dopasowano modele wielowymiarowego zagrożenia proporcjonalnego (proportional hazards, PH) Cox'a w celu oceny głównego celu testów sekwencyjnych ROR, a następnie predefiniowanych kategorii ryzyka na podstawie ROR. Modele obejmowały następujące kat

- wiek (≥ 65 lub < 65),
- stopień (G1 lub G2/GX),
- wielkość guza (T1, T2/T3),
- status węzłów (N0, N+(1-3), N+(≥ 4)),
- leczenie wspomagające (tylko tamoksyfen lub tamoksyfen → anastrozol).

gdzie N0 oznacza pacjentki bez zajętych węzłów chłonnych, N+(1-3) oznacza pacjentki z zajętymi 1-3 węzłami chłonnymi a N+(≥ 4) oznacza pacjentki z zajętymi więcej niż 4 węzłami chłonnymi. T1 oznacza guza o średnicy ≤ 2 cm, T2 guza o średnicy powyżej 2 cm, ale nie większej niż 5 cm, a T3 guza o średnicy ponad 5 cm. W badaniu dostępnych było tylko 14 materiałów T3, dlatego połączono je z materiałami T2. Guzy dobrze zróżnicowane (G1) porównano z połączeniem guzów umiarkowanie zróżnicowanych (G2) i guzów zrazikowych GX. Do celów analizy guzy zrazikowe GX traktowano jak guzy G2, ponieważ G2 to najczęstszy stopień w populacji pacjentek, dla których przeznaczony jest test.

Powyższe zmienne towarzyszące wprowadzono do modelu w postaci wyniku leczenia klinicznego (Clinical Treatment Score, CTS). W celu uzyskania CTS dopasowano następujący model:

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

gdzie z oznacza zmienne kliniczne i leczenia podane powyżej, a CTS zdefiniowano wykorzystując szacunki wartości γ uzyskane powyżej, tj. CTS = $\sum_j z_j \gamma_j$

Założenie hazardu proporcjonalnego przetestowano wykorzystując reszty Shoenfelda.

Pacjentki włączone do badania weryfikacyjnego miały charakterystykę zbliżoną do pacjentek w oryginalnym badaniu ABCSG-8.

Tabela 30: Podsumowanie charakterystyki klinicznej

Charakterystyka	Wartość	Włączone (n = 1478)		Niewłączone (n = 2236)		Razem (n = 3714)	
		Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%
Leczenie	Tylko tamoksyfen	741	50,1%	1108	49,3%	1849	49,8%
	Tamoksyfen → anastrozol	737	49,9%	1128	50,2%	1865	50,2%
Status ER	Ujemny	14	0,9%	32	1,4%	46	1,2%
	Dodatni	1464	99,1%	2199	98,3%	3663	98,6%
	Nieznany	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Stopień	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%
Stan węzłów	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%
Status PgR	Ujemny	260	17,6%	424	18,9%	684	18,4%
	Dodatni	1218	82,4%	1805	80,4%	3023	81,4%
	Nieznany	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
Stadium guza	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%
Wiek	Mediana	63		ND	64		
	Zakres	41-79			41-80		

* Obejmuje pacjentki z > 9 zajętymi węzłami

Tabela 31: Dodatkowa charakterystyka kliniczna

Charakterystyka	Wartość	Liczba pacjentek	Procent pacjentek
Podtyp NanoString	Luminalny A	1004	67,9%
	Luminalny B	418	28,3%
	HER2-Enriched (Z nadekspresją HER2)	48	3,2%
	Basal	8	0,5%
Przerzuty	Odległe	155	10,5%
	Dowolne	194	13,1%
Status HER2	Ujemny	1397	94,5%
	Dodatni	77	5,2%
	Nieznany	4	0,3%

Wyniki

Z 1620 próbek tkanki dostępnych do badania 25 (1,5%) nie przeszło predefiniowanego przeglądu patologicznego pod kątem odpowiedniego guza, 73 z 1595 próbek tkanki (4,6%) z żywotną tkanką inwazyjnego nowotworu nie zaliczyło predefiniowanej specyfikacji kontroli jakości dla wyekstrahowanego RNA, a 44 z 1522 próbek RNA (2,9%) nie uzyskało wyniku zaliczającego kontroli jakości oznaczenia Prosigna, pozostawiając do analizy 1478 (91,2%) próbek.

Z 1478 pacjentek dostępnych do analizy u 155 występowały odległe przerzuty a u 194 wystąpił nawrót lub odległy przerzut lub zgon z powodu raka sutka. Mediana kontroli dla badania wynosiła 10 lat.

Testy analizy pierwotnej wykazały, że wynik ROR zapewnia istotne dodatkowe informacje prognostyczne dla przeżycia bez nawrotów przewyższające standardowe zmienne kliniczne (CTS).

Tabela 32: Podsumowanie testów analizy pierwotnej

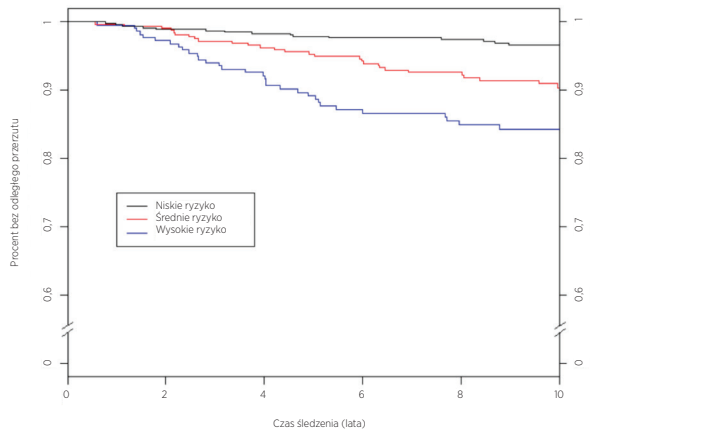
Model zerowy	Model alternatywny	ΔLR χ²	χ² wartość krytyczna (stopnie swobody [df])	χ² wartość p
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Grupa ryzyka	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Analiza wtórna wykazała, że wartość ROR jest w sposób istotny powiązana z przeżyciem bez nawrotów i dodaje informacje prognostyczne przewyższające CTS w wielu znaczących klinicznie podgrupach.

Tabela 33: Powtórzenie testów analizy pierwotnej dla predefiniowanych podgrup

Grupa pacjentek	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń	CTS+ROR vs CTS	CTS+grupa ryzyka vs CTS
			ΔLR χ² (Wart. kryt.= 3,84)	ΔLR χ² (Wart. kryt.= 5,99)
Wszystkie	1478	155	53,49	34,12
Bez nadekspresji HER2	1397	145	47,50	29,94
N0	1047	86	25,57	23,36
N0, bez nadekspresji HER2	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), bez nadekspresji HER2	367	56	22,75	18,75

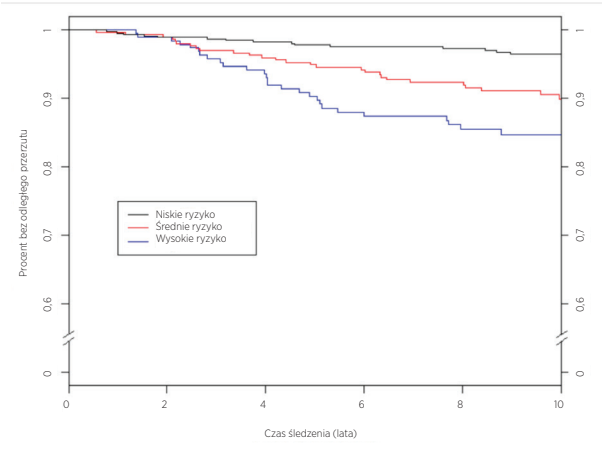
Rysunek 34: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi



Podsumowanie danych z rysunku 34: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba Zdarzenia w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	487 (47%)	15	96,6% [94,4%-97,9%]
Średnie	335 (32%)	28	90,4% [86,3%-93,3%]
Wysokie	225 (21%)	32	84,3% [78,4%-88,6%]
Razem	1047 (100%)	75	

Rysunek 35: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek bez ekspresji HER2 i z wolnymi węzłami chłonnymi

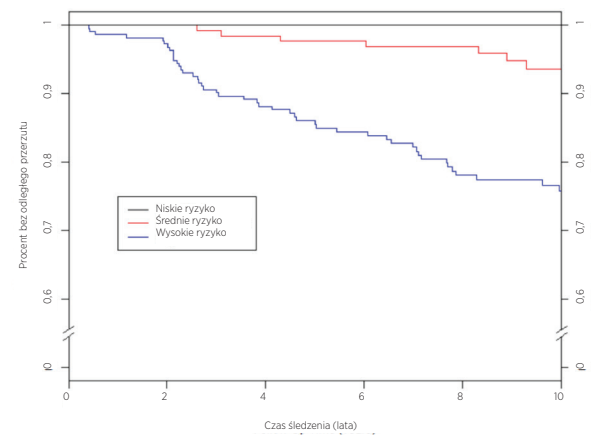


Podsumowanie danych z rysunku 35: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek bez ekspresji HER2 i z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	474 (48%)	15	96,5% [94,3%–97,9%]
Średnie	311 (32%)	27	90% [85,6%–93,1%]
Wysokie	199 (20%)	27	84,7% [78,4%–89,3%]
Razem	984 (100%)	69	

Rysunek 36 przedstawia wykresy Kaplana-Meiera względem grup ryzyka dla pacjentek z zajętymi 1–3 węzłami chłonnymi, a rysunek 37 ten sam wykres dla pacjentek z zajętymi 1–3 węzłami bez nadekspresji HER2. Wyniki są podobne z pacjentkami z nadekspresją HER2 i bez nich

Rysunek 36: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 węzły)

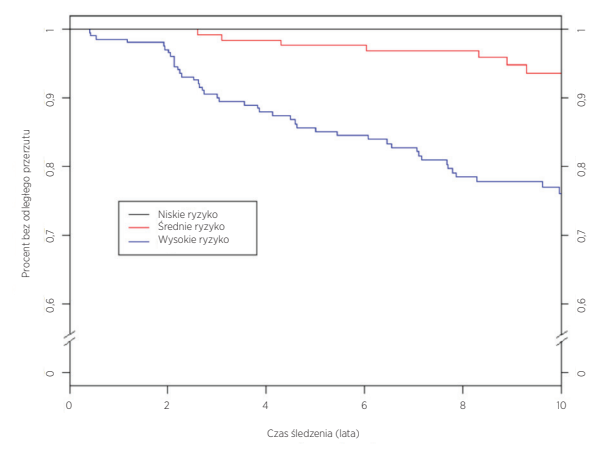


Podsumowanie danych z rysunku 36: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 węzły)

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba Zdarzenia w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	15 (4%)	0	100% [78,2%–100%]*
Średnie	143 (37%)	7	93,6% [86,9%–97%]
Wysokie	224 (59%)	46	75,8% [68,9%–81,4%]
Razem	382 (100%)	53	

* Przedział ufności oszacowany za pomocą metody Clopper-Pearsona

Rysunek 37: Wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek bez nadekspresji HER2 z zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 węzły)



Podsumowanie danych z rysunku 37: wartość DRFS względem grupy ryzyka dla pacjentek bez nadekspresji HER2 z zajętymi węzłami chłonnymi (1–3 węzły)

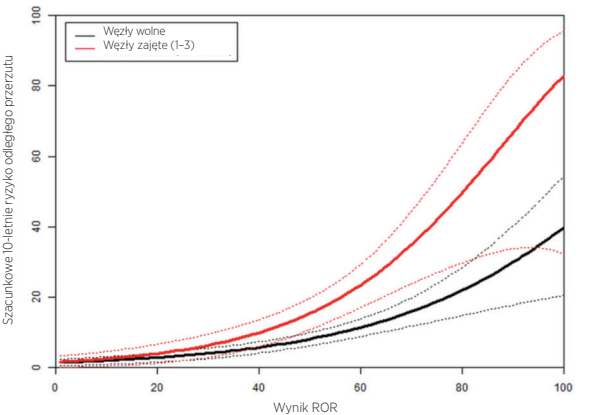
Grupa ryzyka	Liczba pacjentek (%)	Liczba Zdarzenia w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Niskie	15 (4%)	0	100% [78,2%–100%]*
Średnie	142 (39%)	7	93,6% [86,8%–96,9%]
Wysokie	210 (57%)	43	76,1% [69,0%–81,8%]
Razem	367 (100%)	50	

* Przedział ufności oszacowany za pomocą metody Clopper-Pearsona

Związek między ROR a przewidywaniem ryzyka

Rysunek 38 przedstawia 10-letnie ryzyko nawrotów w funkcji wyniku ROR z 95% przedziałami ufności na podstawie osobnych modeli proporcjonalnego hazardu Cox'a dla każdej z grup pacjentek z wolnymi węzłami i zajętymi 1–3 węzłami. Dla pacjentek z zajętymi węzłami (1–3 węzły) założenie proporcjonalnego zagrożenia zostało naruszone przy dopasowywaniu dla całego zakresu. Przedstawiona krzywa dla pacjentek z zajętymi węzłami (1–3 węzły) wykorzystuje pacjentki z zajętymi węzłami (1–3 węzły) z wynikami ROR w zakresie 0–80, dla których spełnione było założenie proporcjonalnego zagrożenia.

Rysunek 38: Dziesięcioletnie szacunkowe ryzyko odległego nawrotu choroby względem kategorii węzłów z 95% przedziałami ufności



W ramach każdej podgrupy bezwzględne ryzyko kliniczne pacjentek przydzielonych do kategorii niskiego ryzyka było znacząco różne od bezwzględnego ryzyka pacjentek przydzielonych do kategorii wysokiego ryzyka.

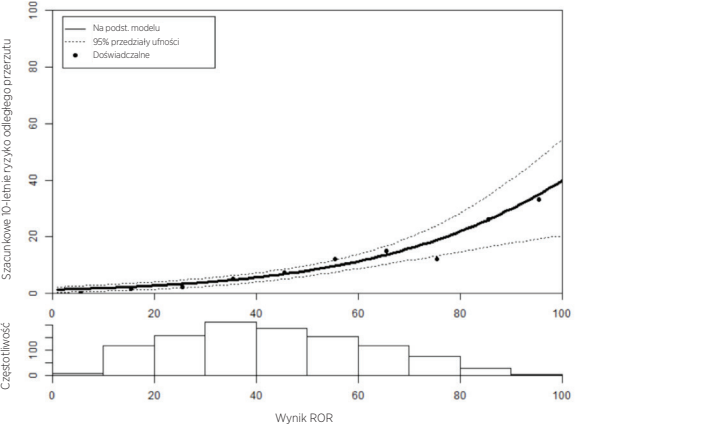
Tabela 34 prezentuje rozkład pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych w 10-jednostkowych przedziałach ROR. Zamieszczono w niej również 10-letnie ryzyko odległego przerzutu.

Tabela 34: Rozkład pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych w 10-jednostkowych przedziałach ROR

Zakres ROR	Liczba pacjentek	Procent pacjentek	10-letnie ryzyko odległego przerzutu (doświadczalne)
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%
Razem	1047	100%	

Rysunek 39 prezentuje krzywą na bazie modelu dla pacjentek bez zajętych węzłów wraz z empirycznie oszacowanymi wskaźnikami 10-letniego przeżycia dla 10 przedziałów, gdzie każdy przedział zawiera wszystkie pacjentki w ramach 10-jednostkowych zakresów ROR (1-10, 11-20 itd.). Pod krzywą zamieszczono histogram prezentujący rozkład częstości według przedziału.

Rysunek 39: Porównanie szacunków na bazie modelu i doświadczeń dla dziesięcioletniego ryzyka nawrotów dla pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych z przedstawionym niżej rozkładem wyników ROR



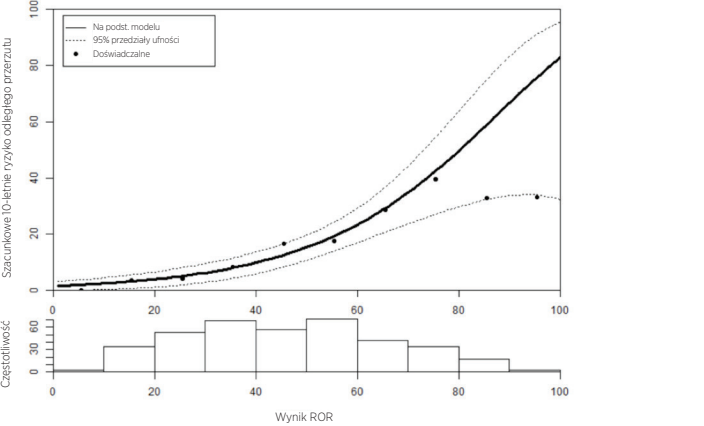
Dla pacjentek z wolnymi węzłami szacunki na podstawie modelu proporcjonalnego hazardu były podobne do szacunków empirycznych w całym zakresie. Tabela 35 prezentuje rozkład pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) w 10-jednostkowych przedziałach ROR. Zamieszczono w niej również 10-letnie ryzyko odległego nawrotu choroby.

Tabela 35: Rozkład pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) w 10-jednostkowych przedziałach ROR

Zakres ROR	Liczba pacjentek	Procent pacjentek	10-letnie ryzyko odległego nawrotu choroby (doświadczalne)
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%
Razem	382	100%	

Rysunek 40 prezentuje krzywą na bazie modelu (dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) i wynikami ROR ≤ 80) dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) wraz z empirycznie oszacowanymi wskaźnikami 10-letniego przeżycia dla 10 przedziałów, gdzie każdy przedział zawiera wszystkie pacjentki w ramach 10-jednostkowych zakresów ROR (1-10, 11-20 itd.). Pod krzywą zamieszczono histogram prezentujący rozkład częstości według przedziału.

Rysunek 40: Porównanie szacunków na bazie modelu i doświadczeń dla dziesięcioletniego ryzyka nawrotów dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły) z przedstawionym niżej rozkładem wyników ROR.



Zarówno tabela 35, jak i rysunek 40 ilustrują spłaszczenie 10-letniego ryzyka w górnym zakresie ROR, które doprowadziło do niepowodzenia założenia proporcjonalnego hazardu. Jednakże należy zauważyć, że liczebności prób w dwóch przedziałach powyżej 80 były małe dla pacjentek z węzłami zajętymi (1-3 węzły) (17 pacjentek w przedziale 81-90 i tylko 3 dla 91-100).

Porównanie typów wewnętrznych luminalny A i luminalny B

U większości uczestniczek badania (96%) występował nowotwór typu luminalny A lub luminalny B, co nie było nieoczekiwane, jako że te podtypy dominują u pacjentek z nadekspresją receptorów hormonalnych¹².

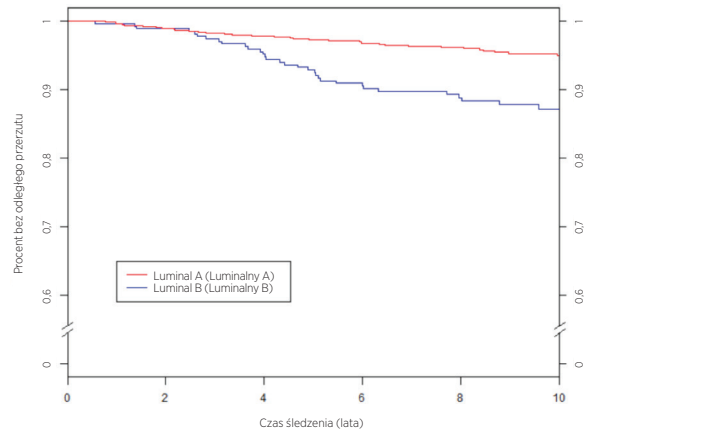
Tabela 36 prezentuje wyniki testu stosunku wiarygodności w celu zaprezentowania dodatkowej wartości prognostycznej dla DRFS dodawanej przez rozróżnienie luminalny A/luminalny B ponad CTS. Tabela przedstawia również stosunek hazardu dla pacjentek z typem luminalnym A w porównaniu do pacjentek z typem luminalnym B. We wszystkich trzech grupach stwierdzono znacząco niższe ryzyko odległego nawrotu choroby dla pacjentek z nowotworem typu luminalny A.

Tabela 36: Test stosunku wiarygodności dla wartości prognostycznej DRFS podtypów luminalnych

Podgrupa	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 wartość p	Stosunek hazardu LumA: LumB (95% CI)
Wszystkie	1422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30-0,59]
NO	1009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30-0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19-0,58]

Rysunek 41 przedstawia porównanie wartości DRFS względem podtypu luminalnego dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi, a rysunek 42 to samo porównanie dla pacjentek z grupy pacjentek z węzłami zajętymi (1-3 węzły). Dla obu grup stwierdzono znaczące różnice między wartościami DRFS pacjentek z nowotworem typu luminalny A i luminalny B.

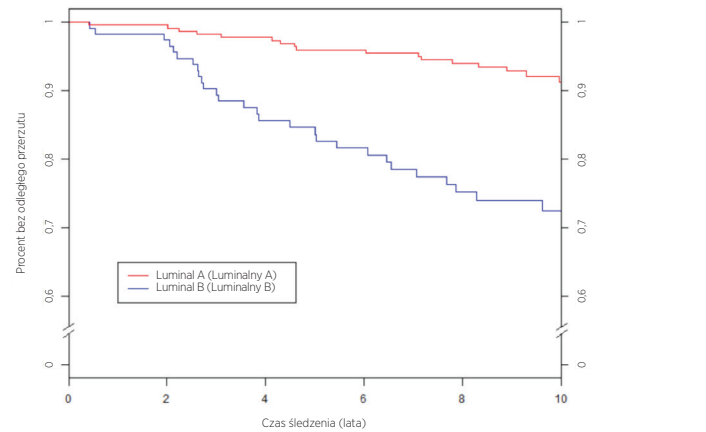
Rysunek 41: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi



Podsumowanie danych z rysunku 41: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z wolnymi węzłami chłonnymi

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba Zdarzenia w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Luminal A (Luminalny A)	725	32	95,1% [93,4%-96,3%]
Luminal B (Luminalny B)	284	32	87,2% [83,2%-90,3%]
Razem	1009	64	

Rysunek 42: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły)



Podsumowanie danych z rysunku 42: Krzywe Kaplana-Meiera dla DRFS z podziałem na podtyp wewnętrzny dla pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi (1-3 węzły)

Grupa ryzyka	Liczba pacjentek	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
Luminal A (Luminalny A)	248	17	91,3% [87,2%-94,2%]
Luminal B (Luminalny B)	118	28	72,5% [64,2%-79,1%]
Razem	366	45	

Tabela 37 przedstawia podsumowanie wskaźników 10-letnich RFS względem podtypu luminalnego dla grup z wolnymi i zajętymi (1-3 węzły) węzłami chłonnymi.

Tabela 37: Wskaźniki 10-letniego RFS względem grupy węzłowej i podtypu luminalnego

Status węzłów	Podtyp luminalny	Liczba pacjentek (%)	Liczba zdarzeń w ciągu 10 lat	Szacunkowa wartość procentowa bez odległego nawrotu choroby po 10 latach [95% CI]
N0	Luminal A (Luminalny A)	725 (72)	44	93,0% [91,1%-94,5%]
	Luminal B (Luminalny B)	284 (28)	44	82,2% [77,6%-85,9%]
N+(1-3)	Luminal A (Luminalny A)	248 (68)	21	89,1% [84,7%-92,4%]
	Luminal B (Luminalny B)	118 (32)	30	71,6% [62,2%-77,4%]

Dla populacji pacjentek z wolnymi i zajętymi (1-3 węzły) węzłami chłonnymi różnica między podtypem luminalnym A i B była znacząca.

Wnioski badania klinicznego 2

Wartość ROR dodaje znaczącą informację prognostyczną przewyższającą standardowe zmienne kliniczne i leczenie, zarówno przy uwzględnieniu jako miara ciągła, jak i przy zastosowaniu trzech predefiniowanych grup ryzyka. Zgodnie z przewidywaniem, w grupie niskiego ryzyka wartość 10-letniego DRFS była znacząco powyżej 90%. W grupie wysokiego ryzyka wartość 10-letniego DRFS wynosiła 80%, co było wartością wyższą od oczekiwanej – oczekiwano, że wartość ta będzie niższa od 80%. Wartości odcięcia zastosowane do zdefiniowania grup ryzyka oparto na grupie TransATAC, która narażona jest na wyższe ryzyko niż bieżąca grupa, co prowadzi do ogólnie niższego ryzyka „grupy wysokiego ryzyka” niż oczekiwano. Wartość ROR (ciągła i na podstawie grup ryzyka) wykazała podobną informację prognostyczną w różnych podgrupach. Model ciągłego ryzyka wykazuje dobrą zgodność z empirycznymi wskaźnikami nawrotów zarówno w populacjach pacjentek z wolnymi, jak i zajętymi (1-3 węzły) węzłami chłonnymi. U większości pacjentek w badaniu (96%) występował jeden z dwóch typów luminalnych guza (A lub B). We wszystkich grupach stanu węzłów rozróżnienie typu luminalny A/luminalny B zwiększało informacje prognostyczne w zakresie DRFS.

Podsumowanie połączonych danych klinicznych

Wyniki można uogólnić do stosowania rozproszonego, ponieważ próbki rozesłano i analizowano w różnych laboratoriach w dwóch klinicznych badaniach weryfikacyjnych. Wartość ROR dodaje znaczącą informację prognostyczną dla 10-letniego DRFS przewyższającą standardowe zmienne kliniczne i leczenie, zarówno przy uwzględnieniu jako miara ciągła, jak i przy zastosowaniu trzech predefiniowanych grup ryzyka. Ponadto w analizie post-hoc parametr ROR dodawał istotne informacje dla DRFS powyżej 5 lat przewyższającą standardowe zmienne kliniczne dla wszystkich pacjentek. Wartość ROR (ciągła i na podstawie grup ryzyka) wykazała podobną informację prognostyczną w różnych podgrupach. Przeprowadzono również ograniczone analizy z wykorzystaniem RFS. Klasy ROR były także w stanie zdefiniować trzy grupy ryzyka z różnymi wartościami RFS. Dla obu grup stwierdzono znaczące różnice między wartościami DRFS pacjentek z nowotworem typu luminalny A i luminalny B, niezależnie od stanu węzłów.

17 LITERATURA

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317-25.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009; 27(8): 1160-1167.
- Dowsett M. et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783-90.
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222-5232.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458-471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731-734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Volume 24.
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. Journal of Clinical Oncology 2014; Oct 20 ePub ahead of print JCO.2014.55.6894.
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12):1135-41.
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012;30(7): 722-728.
- Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829-1834.
- Cuzick J, et. al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 2011; 29: 4273-4278.

13. (a) Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: Combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005; 366(9484): 455-462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncology* 2006; 7(12): 991-996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of Oncology* 2014; 25(2):339-45.

18 SYMBOLE I DEFINICJE

 – Producent

EC REP – Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej

IVD – Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

 i – Zapoznać się z instrukcją obsługi

CE – Znak CE

LOT – Numer partii/numer serii

REF – Numer katalogowy lub referencyjny

 – Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <n> testów

 – Zakres temperatur przechowywania

 – Dolna granica temperatury przechowywania

 – Górna granica temperatury przechowywania

 – Zużyć przed/data ważności

 – Tą stroną do góry

Room Temp. = temperatura pokojowa

HYB = Hybrydyzacja

Zastrzeżenie dotyczące zgodności z przepisami

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

© 2023 Veracyte, Inc. i podmioty stowarzyszone. Wszelkie prawa zastrzeżone. Veracyte, logo Veracyte, Prosigna i logo Prosigna są zarejestrowanymi znakami towarowymi spółki Veracyte, Inc. i jej podmiotów stowarzyszonych. nCounter jest znakiem towarowym firmy NanoString Technologies, Inc. i stosowany na licencji.

19 DANE KONTAKTOWE

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

EC REP

Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Ogólnoświatowe dane kontaktowe:

Adres e-mail wsparcia technicznego: DxSupport@Veracyte.com
Adres e-mail informacji o produkcie: info@prosigna.com
Strona internetowa: www.prosigna.com