

Ένθετο συσκευασίας
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
(Προσδιορισμός γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής
καρκίνου του μαστού Prosigna®)







Έκδοση 01, ημ/μία δημιουργίας 07-2023



1-10 δοκιμασίες

Συνθήκες φύλαξης

 -20°C Να φυλάσσεται στους -20°C και κάτω	Cartridges Προσδιορισμού γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna
 -80°C Να φυλάσσεται στους -80°C και κάτω	CodeSet Προσδιορισμού γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna
 +25°C Να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου	Prep Pack Προσδιορισμού γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna
 +2°C Να φυλάσσεται στους +4°C	Prep Plate Προσδιορισμού γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / ΣΚΟΠΟΣ	1
2	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ	1
2.1	Αρχές του Συστήματος ανάλυσης nCounter.....	2
2.2	Αρχές του αλγόριθμου Prosigna για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων	2
3	ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	2
3.1	Επισκόπηση του Kit Prosigna	2
3.2	Περιεχόμενα του kit Prosigna για Kit Prosigna 1, 2, 3, 4, ή 10 δοκιμασιών.....	3
4	ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	3
5	ΓΕΝΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ	3
5.1	Επεξεργασία ιστού.....	3
5.2	Διεξαγωγή του προσδιορισμού Prosigna	4
6	ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ	4
7	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ	4
8	ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ (ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ)	4
9	ΟΡΓΑΝΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ PROSIGNA	4
10	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ	4
10.1	Υλικά	4
10.2	Εξοπλισμός.....	4
10.3	Προδιαγραφές εξοπλισμού.....	4
11	ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	5
11.1	Ανασκόπηση απαιτήσεων και παθολογίας δειγμάτων ιστού.....	5
11.2	Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων	5
11.3	Παρασκευή πλακιδίων	5
11.4	Επεξεργασία πλακιδίων	5
11.5	Απομόνωση του RNA.....	6
11.6	Μέτρηση της συγκέντρωσης και της ποιότητας RNA.....	6
11.7	Διαδικασία προσδιορισμού.....	7
12	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	9
13	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	9
13.1	Ενδογενείς υπότυποι	9
13.2	Βαθμολογία ROR.....	10
13.3	Πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη.....	10
13.4	Ταξινόμηση κινδύνου.....	10
13.5	Ποιοτικός έλεγχος.....	10
14	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ	10
15	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ	11
15.1	Εύρος βαθμολογίας ROR κατά υπότυπο.....	11
15.2	Συχνότητα βαθμολογίας ROR κατά κατάσταση λεμφαδένων	11
15.3	Επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής κατά κατηγορία κινδύνου... 11	11

16	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	12
16.1	Αναλυτική ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα.....	12
16.2	Ευαισθησία / Εισόδος RNA.....	13
16.3	Έλεγχος παρεμβολών.....	13
16.4	Κλινική απόδοση.....	14
17	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	25
18	ΣΥΜΒΟΛΑ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ	26
19	ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	26

1 ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / ΣΚΟΠΟΣ

Ο Προσδιορισμός γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna® είναι ένας *in vitro* διαγνωστικός προσδιορισμός, που χρησιμοποιεί το προφίλ γονιδιακής έκφρασης κυττάρων που απαντώνται σε ιστούς προσβεβλημένους από καρκίνο του μαστού για την εκτίμηση του κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής σε μία ασθενή. Ο προσδιορισμός μετράει το προφίλ γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση RNA από ιστό όγκου μαστού μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE). Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης σταθμίζονται μαζί με κλινικές μεταβλητές, έτσι ώστε να παραχθεί ο υπότυπος (αυλικού τύπου A, αυλικού τύπου B, HER2-εμπλουτισμένος ή βασικού τύπου) και μια βαθμολογία που υποδεικνύει την πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής της νόσου. Ο προσδιορισμός διεξάγεται στο Σύστημα ανάλυσης nCounter® με τη χρήση ιστού όγκου μαστού FFPE, με προηγούμενη διάγνωση διηθητικού καρκινώματος του μαστού.

Ο Προσδιορισμός γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna ενδείκνυται σε ασθενείς θηλυκού γένους με καρκίνο του μαστού που έχουν υποβληθεί σε μαστεκτομή ή θεραπεία διατήρησης του στήθους σε συνδυασμό με τοπιοπεριοχική αντιμετώπιση σύμφωνα με το πρότυπο φροντίδας, ως:

- Προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα (HR+), αρνητικών λεμφαδένων, σταδίου I ή II για θεραπεία μόνο με επικουρική ενδοκρινική θεραπεία, κατά τη συνδυαστική χρήση με άλλους κλινικούς/παθολογοανατομικούς παράγοντες.
- Προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα (HR+), θετικών λεμφαδένων (1-3 θετικοί λεμφαδένες ή 4 και άνω θετικοί λεμφαδένες, σταδίου II ή IIIA για θεραπεία μόνο με επικουρική ενδοκρινική θεραπεία, κατά τη συνδυαστική χρήση με άλλους κλινικούς/παθολογοανατομικούς παράγοντες.

2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ

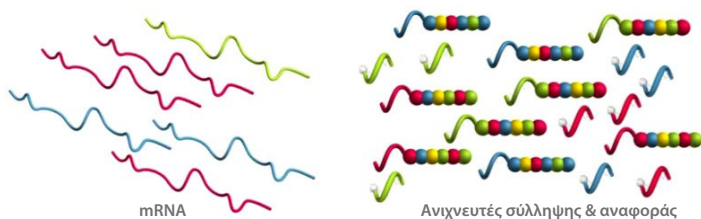
Το Σύστημα ανάλυσης nCounter παρέχει άμεσες, πολυπλεγμένες μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης μέσω ψηφιακών ενδείξεων της σχετικής αφθονίας των μεταγραφών mRNA, χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα βήματα: 1) υβριδοποίηση του RNA σε φθορίζοντες ανιχνευτές αναφοράς και ανιχνευτές σύλληψης, 2) κάθαρση των συμπλόκων στόχου/ανιχνευτή με τη χρήση των Prep Plates (Πλακίδια) nCounter Prep nCounter που περιέχουν τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για την επεξεργασία και την ακινητοποίηση μετά την υβριδοποίηση στη Cartridge (Φύσιγγα) nCounter στο Prep Station (Σταθμός) nCounter και 3) ανάλυση της Cartridge (Φύσιγγα) nCounter στο digital analyzer (ψηφιακός αναλυτής nCounter για την παροχή αποτελέσματος της δοκιμασίας). Τόσο οι ανιχνευτές σύλληψης όσο και οι ανιχνευτές αναφοράς περιέχουν μοναδικές αλληλουχίες ανιχνευτή DNA για την υβριδοποίηση και κάθαρση του στόχου. Οι ανιχνευτές σύλληψης και αναφοράς συνδυάζονται με τα θετικά και αρνητικά υλικά ελέγχου ώστε να σχηματίσουν το CodeSet. Ο Prosigna μετράει ταυτόχρονα τα επίπεδα έκφρασης 50 γονιδίων που χρησιμοποιούνται για τον αλγόριθμο ταξινόμησης ενδογενούς υποτύπου², 8 γονιδίων κυτταρικής οικονομίας που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση του σήματος, 6 θετικών υλικών ελέγχου και 8 αρνητικών υλικών ελέγχου σε μία και μόνο αντίδραση υβριδοποίησης με ανιχνευτές νουκλεϊνικών οξέων, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί ειδικά για αυτά τα γονίδια. Στο kit Prosigna περιλαμβάνεται επίσης ένα Δείγμα Αναφοράς, που αποτελείται από *in vitro* μεταγραφμένους στόχους RNA για κάθε ένα από τα 58 γονίδια. Το Δείγμα Αναφοράς ελέγχεται με κάθε παρτίδα δειγμάτων RNA ασθενούς, ως προς τα χαρακτηριστικά που προσιδιάζουν για την ανάλυση και την κανονικοποίηση του σήματος από κάθε γονίδιο.

Ο Προσδιορισμός Prosigna διεξάγεται σε RNA απομονωμένο από ιστό καρκίνου του μαστού FFPE. Ένας παθολογοανατόμος εξετάζει ένα πλακίδιο χρωσμένο με αιματοξυλίνη και ιωσίνη (H&E) και προσδιορίζει (επισημαίνει) την περιοχή του διηθητικού καρκινώματος του μαστού που είναι κατάλληλη για τη δοκιμασία. Ο παθολογοανατόμος επίσης μετράει το εμβαδόν επιφάνειας του όγκου, το οποίο καθορίζει τον αριθμό των μη χρωσμένων πλακιδίων που απαιτούνται για τη δοκιμασία, και την κυτταροβίθρα του όγκου, έτσι ώστε να διασφαλίσει την παρουσία επαρκούς καρκινικού ιστού για τη δοκιμασία. Ένας εκπαιδευμένος τεχνολόγος εκτελεί μακροεκτομή της περιοχής στα μη χρωσμένα πλακίδια, αντίστοιχα με τη σημασμένη επιφάνεια όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο και απομονώνει το RNA από τον ιστό. Στη συνέχεια, το απομονωμένο RNA υποβάλλεται σε δοκιμασία στο Σύστημα ανάλυσης nCounter παρέχοντας αποτελέσματα από τη δοκιμασία, συμπεριλαμβανομένου του ενδογενούς υποτύπου, της βαθμολογίας του δείκτη Κινδύνου υποτροπής (ROR) και της κατηγορίας κινδύνου.

2.1 Αρχές του Συστήματος ανάλυσης nCounter

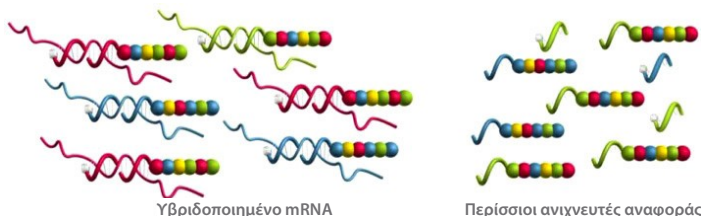
Το Σύστημα ανάλυσης nCounter χρησιμοποιεί ζεύγη ανιχνευτών ειδικών για τα γονίδια (Εικόνα 1) που υβριδοποιούνται απευθείας με το δείγμα mRNA στο διάλυμα, εξαλείφοντας τις ενζυμικές αντιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις στα αποτελέσματα. Στο πρώτο βήμα του προσδιορισμού, οι ανιχνευτές DNA υβριδοποιούνται απευθείας σε μια περιοχή 70-100 ζευγών βάσεων του δείγματος RNA σε διάλυμα. Ο ανιχνευτής αναφοράς αποτελείται από μια αλληλουχία ανιχνευτών 35-50 βάσεων που είναι συμπληρωματική του στόχου mRNA και μια μοναδική αλληλουχία - σκελετό DNA που υβριδοποιείται με έξι τμήματα του RNA, σημασμένα με μία από τις τέσσερις χρωστικές φθορισμού: κόκκινη (R), κίτρινη (Y), μπλε (B) ή πράσινη (G). Τα τμήματα φθορισμού δημιουργούν έναν «χρωματικό κωδικό» φθορισμού έξι θέσεων/τεσσάρων χρωμάτων που είναι μοναδικός για κάθε στόχο. Ένας ξεχωριστός ανιχνευτής σύλληψης αποτελείται από μια αλληλουχία ανιχνευτών 35-50 βάσεων που είναι συμπληρωματική του στόχου mRNA και βιοτίνη, η οποία χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση σε ένα επικαλυμμένο με στρεπταβιδίνη πλακίδιο.

Εικόνα 1: Υβριδοποίηση CodeSet στο mRNA

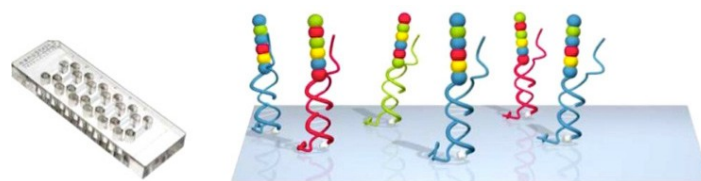


Μετά την υβριδοποίηση, όλα τα βήματα καθαρισμού του δείγματος είναι αυτοματοποιημένα στο Σταθμό Preper nCounter. Πρώτα, αφαιρούνται οι περίσσειοι ανιχνευτές σύλληψης και αναφοράς (Εικόνα 2) με διαδοχικά βήματα σύλληψης μαγνητικών σφαιριδίων που ακολουθούνται από δέσμευση των συμπλόκων ανιχνευτών-στόχου σε τυχαίες θέσεις στην επιφάνεια της Φύσιγγας nCounter μέσω ενός δεσμού στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (Εικόνα 3). Τέλος, τα σύμπλοκα ανιχνευτών/στόχου ευθυγραμμίζονται και ακινητοποιούνται (Εικόνα 4) στη Φύσιγγα nCounter.

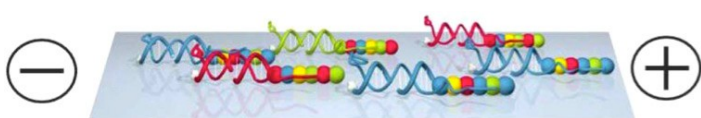
Εικόνα 2: Αφαίρεση περίσσειων ανιχνευτών αναφοράς



Εικόνα 3: Δέσμευση υβριδοποιημένων ανιχνευτών αναφοράς στην επιφάνεια της φύσιγγας



Εικόνα 4: Ευθυγράμμιση και ακινητοποίηση υβριδοποιημένων ανιχνευτών αναφοράς



Όταν ολοκληρωθεί η επεξεργασία του δείγματος, η Φύσιγγα τοποθετείται στον Ψηφιακό αναλυτή nCounter για συλλογή δεδομένων. Κάθε μόριο - στόχος ενδιαφέροντος αναγνωρίζεται από τον «χρωματικό κωδικό» που παράγεται από τα έξι διατεταγμένα στίγματα φθορισμού που υπάρχουν στον αντίστοιχο ανιχνευτή αναφοράς. Οι ανιχνευτές αναφοράς στην επιφάνεια της Φύσιγγας καταμετρώνται και πινακογραφούνται για κάθε μόριο - στόχο και υποβάλλονται σε επεξεργασία με τον αλγόριθμο (Εικόνα 5).

Εικόνα 5: Συλλογή δεδομένων

Κωδικός	Γονίδιο	Μέτρηση
●●●●●●	x	3
●●●●●●	y	1
●●●●●●	z	2

2.2 Αρχές του αλγόριθμου Prosigna για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων

Η δοκιμασία βασίζεται στον αλγόριθμο ταξινόμησης 50 γονιδίων με αρχικό όνομα PAM50² και διεξάγεται στο Σύστημα ανάλυσης nCounter με τη χρήση RNA εξαγμένου από δείγματα ιστών καρκίνου του μαστού, μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE). Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ένα προφίλ έκφρασης 50 γονιδίων για να αντιστοιχίσει τον καρκίνο του μαστού σε μία από τέσσερις μοριακές κατηγορίες ή ενδογενείς υποτύπους: Αυλικού τύπου A, Αυλικού τύπου B, HER2-εμπλουτισμένος ή Βασικού τύπου². Τα πρωτότυπα προφίλ γονιδιακής έκφρασης (π.χ., κεντροειδές) των τεσσάρων ενδογενών υποτύπων έχουν υποβληθεί σε εκ νέου εκμάθηση στο Σύστημα ανάλυσης nCounter με τη χρήση δειγμάτων καρκίνου του μαστού FFPE συλλεγμένα από πολλές κλινικές τοποθεσίες στη Βόρεια Αμερική. Μετά τη διεξαγωγή του προσδιορισμού σε ένα δείγμα δοκιμασίας ασθενούς, ένας υπολογιστικός αλγόριθμος με βάση το συσχετισμό του Pearson συγκρίνει το κανονικοποιημένο προφίλ έκφρασης 50 γονιδίων του δείγματος του ασθενούς με τα πρωτότυπα προφίλ έκφρασης των τεσσάρων ενδογενών υποτύπων του καρκίνου του μαστού. Στο δείγμα του ασθενούς εκχωρείται ο υπότυπος με τον υψηλότερο συσχετισμό του Pearson.

Ο αλγόριθμος στη συνέχεια αναφέρει τη βαθμολογία του δείκτη υποτροπής (ROR) σε κλίμακα 0–100³, που συσχετίζεται με την πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής στα δέκα έτη για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα και πρώιμου σταδίου⁴. Η αναφορά παρέχει επίσης την κατηγορία κινδύνου (χαμηλός, μεσαίος ή υψηλός). Η βαθμολογία ROR υπολογίζεται με τη χρήση συντελεστών από ένα μοντέλο Cox που περιλαμβάνει το συσχετισμό του Pearson ενός υποσυνόλου 46 γονιδίων από τα 50 γονίδια με κάθε κεντροειδές ενδογενούς υποτύπου, μια βαθμολογία πολλαπλασιασμού και το χονδρικό μέγεθος όγκου. Οι μεταβλητές της δοκιμασίας πολλαπλασιάζονται με τους αντίστοιχους συντελεστές από το μοντέλο Cox για να παραχθεί η βαθμολογία, που στη συνέχεια προσαρμόζεται στην κλίμακα 0–100 με βάση τους συντελεστές που παράγονται από την εκπαιδευτική σειρά δειγμάτων καρκίνου του μαστού FFPE. Αναφέρονται επίσης οι κατηγορίες κινδύνου με βάση τις τιμές αποκοπής για τη βαθμολογία ROR που έχουν καθοριστεί σε μια κλινική μελέτη επικύρωσης.

3 ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

3.1 Επισκόπηση του Κιτ Prosigna

Το κιτ Prosigna περιλαμβάνει αντιδραστήρια που επαρκούν για την επεξεργασία 1, 2, 3, 4, ή 10 δειγμάτων ασθενούς ανάλογα με το προϊόν της παραγωγής. Για πληροφορίες σχετικά με την παραγωγή, δείτε παρακάτω. Το κιτ Prosigna περιέχει ένα CodeSet, ένα σωληνάριο δείγματος αναφοράς για κάθε σετ που περιέχει μία έως δέκα δοκιμασίες και αναλύσιμα στοιχεία, των οποίων ο συνδυασμός έχει δοκιμαστεί ως προς την απόδοση πριν από τη διάθεσή τους.

Κωδικός καταλόγου	Αριθμός δοκιμασιών στο κιτ	Σωληνάρια Δειγμάτων Αναφοράς που περιλαμβάνονται
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Συνιστάται για χρήση σε συνδυασμό με το Κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche (Roche-FFPET-025) ή το κιτ εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte (550100). Και τα δύο κιτ εκχύλισης RNA είναι διαθέσιμα μόνο μέσω της Veracyte.

3.2 Περιεχόμενα του κιτ Prosigna για Κιτ Prosigna 1, 2, 3, 4, ή 10 δοκιμασιών

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

Prosigna Prep Plates

Prep Plates	<i>superparamagnetic beads, buffer, salts, oligonucleotides, polystyrene beads containing fluorescent dyes</i>
-------------	--

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)	<i>sample cartridge(s)</i>
-----------------------	----------------------------

Prosigna Prep Pack

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

4 ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση.
2. Ο προσδιορισμός αυτός προορίζεται να εκτελείται από χειριστές εκπαιδευμένους σε τεχνικές μοριακής βιολογίας υψηλού βαθμού πολυπλοκότητας, με βάση τους τοπικούς κανονισμούς.
3. Μην ανακατεύετε τα επιμέρους στοιχεία των κιτ μεταξύ διαφορετικών παρτίδων Prosigna. Η λειτουργία εξασφαλίζεται μόνο για τις παρτίδες των κιτ Prosigna που παρέχονται, καθώς έχουν κατασκευαστεί με ανάλογες ιδιότητες.
4. Τα αντιδραστήρια που εναπομένουν δεν πρέπει να επαναχρησιμοποιούνται στον Προσδιορισμό Prosigna.
5. Αντιμετωπίστε τυχόν αντιδράσεις με προσαρμογή των χρόνων ή των θερμοκρασιών υβριδοποίησης.
6. Είναι σημαντικό να διατηρείται η ακεραιότητα της αλυσίδας δειγμάτων υπό φύλαξη (ιστός προς RNA και RNA προς προσδιορισμό), έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι το αναγνωριστικό δείγματος ασθενούς συσχετίζεται με το σωστό αποτέλεσμα δοκιμασίας.
7. Η αδυναμία φύλαξης των αντιδραστηρίων στις συνθήκες που αναφέρονται στην ετικέτα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση του προσδιορισμού.
8. Φοράτε πάντα γάντια κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων και δειγμάτων.
9. Αποφεύγετε τη μόλυνση Ριβονουκλεάσης (RNase), η οποία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα των αποτελεσμάτων.

10. Όλα τα βιολογικά δείγματα και υλικά πρέπει να υφίστανται τη μεταχείριση που θα είχαν εάν υπήρχε το ενδεχόμενο μετάδοσης μολυσματικών παραγόντων και πρέπει να απορρίπτονται με τις κατάλληλες προφυλάξεις σύμφωνα με τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς και τοπικούς κανονισμούς.
11. Μην εκτελείτε ποτέ αναρρόφηση με το στόμα.
12. Αποφεύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων με τα μάτια, το δέρμα και τους βλεννογόνους υμένες.
13. Χρησιμοποιείτε τις βέλτιστες εργαστηριακές μοριακές πρακτικές προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων δοκιμασίας ή με στόχους νουκλεϊνικού οξέος υψηλής συγκέντρωσης (συνθετικά ή ενισχυμένα με PCR), ώστε να μην επηρεαστεί αρνητικά η ποιότητα των αποτελεσμάτων.
14. Μετά την επεξεργασία, πολύ χαμηλά επίπεδα αζιδίου του νατρίου (<0,1%) περιέχονται στα Πλακίδια Prep Prosigna και στις Φύσιγγες nCounter και συνιστάται η χρήση πλαστικών (όχι μεταλλικών) υποδοχών αποβλήτων για την απόρριψή τους. Παρόλο που είναι εξαιρετικά άβιανο για το Prosigna, η συσσώρευση αζιδίου του νατρίου σε μέταλλα είναι γνωστό ότι αποτελεί κίνδυνο έκρηξης.
15. Μπορείτε να βρείτε πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την απόρριψη συγκεκριμένων οργάνων στο Εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος ανάλυσης nCounter και στο Εγχειρίδιο σέρβις για το Σταθμό Prep και τον Ψηφιακό αναλυτή.
16. Μπορείτε να βρείτε πληροφορίες σχετικά με τα δελτία δεδομένων ασφαλείας υλικών για το CodeSet αναφοράς, το ProbeSet σύλληψης, το Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης και τα Πλακίδια Prep στη διεύθυνση www.prosigna.com.
17. Όλα τα επιβλαβή υλικά πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ιδρύματός σας για την απόρριψη επιβλαβών αποβλήτων.
18. Αν κάποιο CodeSet δεν έχει χρησιμοποιηθεί, πρέπει να απορρίπτεται.
19. Εάν μια κατηγορία μεγέθους όγκου ασθενούς εισαχθεί στο λογισμικό λάθος, η βαθμολογία ROR και η ταξινόμηση των κινδύνων μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά (π.χ. μετατοπισμένη βαθμολογία ROR ή/και εσφαλμένη ταξινόμηση).
20. Αν η κατάσταση λεμφαδένων μίας ασθενούς εισαχθεί στο λογισμικό λάθος, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της ασθενούς μπορεί να αναφερθούν λάθος (π.χ. εσφαλμένη ταξινόμηση κινδύνων).
21. Μην χρησιμοποιείτε RNA ανεπαρκούς ποιότητας ή ποσότητας ούτε δείγματα όγκου με ανεπαρκές εμβαδόν επιφάνειας όγκου ή κυτταροβίθρεια στον Προσδιορισμό Prosigna. Ο Προσδιορισμός Prosigna μπορεί να μην μπορεί να δώσει έγκυρο αποτέλεσμα και θα αναφέρει αποτυχία προσδιορισμού.

5 ΓΕΝΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

1. Ο προσδιορισμός προορίζεται για χρήση μόνο σε δείγματα καρκίνου του μαστού μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) από χειρουργική εκτομή. Δεν προορίζεται για χρήση σε υγρό, κατεψυγμένο ιστό ή ιστό καρκίνου που δεν προέρχεται από το μαστό.
2. Για τη διεξαγωγή του προσδιορισμού, απαιτείται το χονδρικό μέγεθος του πρωτογενούς όγκου και η κατάσταση λεμφαδένων μίας ασθενούς.
3. Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα αναλώσιμα ρύγχη μικροπιπέτας προς αποφυγή μικροβιακής μόλυνσης και μόλυνσης νουκλεάσης των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων κατά την επεξεργασία.
4. Διατηρείτε τα απομονωμένα δείγματα RNA σε υγρό πάγο, όταν δεν τα χειρίζεστε εκείνη τη στιγμή.
5. Απαιτούνται βαθμονομημένα θερμοόμετρα για τα συγκροτήματα θέρμανσης.
6. Μην χρησιμοποιείτε επιμέρους στοιχεία των κιτ που παρουσιάζουν βλάβη κατά την άφιξή τους.
7. Συνιστάται η ανάπτυξη κλινικών στοιχείων ελέγχου (π.χ. για την κατηγορία κινδύνων) και η χρήση τους από τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν τον Προσδιορισμό Prosigna, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων στην πάροδο του χρόνου ως τμήμα των τυπικών εργαστηριακών διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου.

5.1 Επεξεργασία ιστού

1. Η αδυναμία ορθής αφαίρεσης του περιβάλλοντος μη καρκινικού/ φυσιολογικού ιστού με μακροεκτομή κατά την επεξεργασία του ιστού μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του κινδύνου λόγω αναφοράς στον ιατρό χαμηλότερης βαθμολογίας ROR.
2. Η αδυναμία ορθής αφαίρεσης ανθρώπινου γενωμικού DNA κατά την απομόνωση του RNA μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερο ποσοστό αποτυχίας λόγω χαμηλότερου σήματος προσδιορισμού ή σε υπερεκτίμηση του κινδύνου λόγω αναφοράς στον ιατρό υψηλότερης βαθμολογίας ROR.
3. Όλες οι μη χρωσμένες τομές ιστού πρέπει να τοποθετούνται σε θετικά φορτισμένες πλάκες μικροσκοπίου προς αποφυγή απόσπασης κατά την επεξεργασία του ιστού.
4. Για δείγματα που απαιτούν πολλά πλακίδια, όλα τα πλακίδια πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία ταυτόχρονα.
5. Οι τομές ιστού σε πλακίδια ενδέχεται να υποβαθμιστούν, εάν φυλαχθούν για διάστημα μεγαλύτερο από 9 μήνες σε αφυδατωμένο περιβάλλον.
6. Προς αποφυγή μόλυνσης, πρέπει να αντικαθιστάτε το διάλυμα εργασίας γλυκερόλης 3% κάθε εβδομάδα ή εάν το διάλυμα γίνει θολό.

- Αλλάξτε τα περιεχόμενα πλύσης πρώτου D-Λιμονένιου μετά την επεξεργασία 4 σειρών πλακιδίων και τα περιεχόμενα του τρυβλίου χρώσης Αιθανόλης (EtOH) και δεύτερου D-Λιμονένιου μετά την επεξεργασία 8 σειρών πλακιδίων προς αποφυγή υποβάθμισης της ποιότητας του ιστού.
- Προσέχετε όταν κάνετε το περίγραμμα της περιοχής του όγκου στο μη χρωμαμένο πλακίδιο και όταν αφαιρείτε μη καρκινικό ιστό, ώστε να διασφαλίσετε ότι ο ιστός όγκου είναι άθικτος.
- Χειρίστετε τα αιχμηρά εργαλεία με προσοχή κατά τη μακροτομή.
- Χρησιμοποιείτε νέα ευριστική λεπίδα για κάθε δείγμα ιστού που υποβάλλεται σε επεξεργασία.
- Το 10% SDS συχνά υφίσταται καθίζηση σε θερμοκρασία δωματίου και πρέπει να θερμαίνεται στους 37°C μέχρι να διαλυθούν οι καθιζήσεις.*
- Οι νέες παρτίδες των kit απομόνωσης RNA πρέπει να ελέγχονται ως προς τις προδιαγραφές των kit απομόνωσης, ώστε οι νέες παρτίδες των kit να είναι κατάλληλες για δοκιμασίες ασθενών (για λεπτομέρειες, βλ. ενότητα 11.5).

*Το 10% SDS απαιτείται αλλά δεν παρέχεται για το kit απομόνωσης RNA από FFPE της Roche.

5.2 Διεξαγωγή του προσδιορισμού Prosigna

- Βεβαιωθείτε ότι το χονδρικό μέγεθος του πρωτογενούς όγκου της ασθενούς έχει εισαχθεί σωστά στο λογισμικό.
- Βεβαιωθείτε ότι η κατάσταση λεμφαδένων της ασθενούς έχει εισαχθεί σωστά στο λογισμικό.
- Επαληθεύστε ότι το συγκρότημα θέρμανσης με θερμαινόμενο καπάκι που απαιτείται για την υβριδοποίηση πληροί τις προδιαγραφές και βαθμονομείται τακτικά.
- Χρησιμοποιείτε μόνο τα αναλώσιμα που σας έχουν παρασχεθεί με το kit Prosigna. Έχουν σχεδιαστεί ειδικά ώστε να λειτουργούν με το Σταθμό Prep nCounter και τον Ψηφιακό αναλυτή nCounter.
- Αν το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης φυλασσόταν σε χαμηλές θερμοκρασίες και παρατηρήσετε καθίζηση, θερμάνετε τα σωληνάρια στους 37°C μέχρι να διαλυθούν τα άλατα.
- Μην ανακατεύετε ή μεταφέρετε με πιπέτα τα στοιχεία του προσδιορισμού για να αναμιχθούν, καθώς μπορεί να προκληθεί βλάβη στα αντιδραστήρια. Η ανάμιξη πρέπει να πραγματοποιείται με πιπέτα.
- Μην φυγοκεντρίσετε το CodeSet αναφοράς με ταχύτητα μεγαλύτερη από $3.000 \times g$ για διάστημα μεγαλύτερο από 10 δευτερόλεπτα. Μην χρησιμοποιείτε την επιλογή «παλμού» για τη φυγοκέντρωση. Μπορεί να προκληθεί καθίζηση του CodeSet.
- Διατηρείτε τις αντιδράσεις υβριδοποίησης στους 65°C μέχρι να είναι έτοιμες για μεταφορά στο Σταθμό Prep. Αν το συγκρότημα θέρμανσης ρυθμιστεί για κατάπτωση στους 4°C ή τοποθετηθούν δείγματα στον πάγο στο τέλος της υβριδοποίησης, μπορεί να προκληθεί διασταυρούμενη υβριδοποίηση και πιθανώς υποβάθμιση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.
- Η αδυναμία τοποθέτησης των σειρών σωληναρίων στους 65°C μέσα σε 15 λεπτά από την προσθήκη του ProbeSet σύλληψης μπορεί να προκαλέσει διασταυρούμενη υβριδοποίηση και πιθανώς υποβάθμιση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.
- Η αδυναμία εκκίνησης της επεξεργασίας στο Σταθμό Prep μέσα σε 15 λεπτά από την αφαίρεση των δειγμάτων από τους 65°C, μπορεί να προκαλέσει διασταυρούμενη υβριδοποίηση και πιθανώς υποβάθμιση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.
- Βεβαιωθείτε ότι τα πώματα της σειράς σωληναρίων είναι σφραγισμένα πριν την υβριδοποίηση στο συγκρότημα θέρμανσης προς αποφυγή εξάτμισης και πιθανώς υποβάθμισης των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.

6 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ο προσδιορισμός αυτός προορίζεται να εκτελείται από επαγγελματίες χειριστές, εκπαιδευμένους σε τεχνικές μοριακής βιολογίας υψηλού βαθμού πολυπλοκότητας, με βάση τους τοπικούς κανονισμούς. Επικοινωνήστε με την Veracyte για πληροφορίες σχετικά με την εκπαίδευση που αφορά ειδικά την εκτέλεση του Προσδιορισμού Prosigna.

7 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος ανάλυσης nCounter για λεπτομέρειες σχετικά με τη διαχείριση των αποβλήτων από τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές IVD.

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του επιλεγμένου kit εκχύλισης RNA για τη διαχείριση των αποβλήτων και λεπτομέρειες ειδικά για τα αντιδραστήρια εκχύλισης RNA.

8 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ (ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ)

Η ημερομηνία λήξης για όλα τα στοιχεία του kit του προσδιορισμού αναφέρεται στην ετικέτα γραμμωτού κωδικού που παρέχεται με το κουτί CodeSet, καθώς και στην εξωτερική σήμανση του κουτιού για όλα τα στοιχεία Prosigna.

- Τα στοιχεία του κουτιού Prosigna CodeSet (CodeSet αναφοράς Prosigna, ProbeSet σύλληψης Prosigna και Δείγμα Αναφοράς RNA Prosigna) πρέπει να φυλάσσονται στους -80°C και κάτω.
- Οι Φύσιγγες Cartridges (Φύσιγγες) nCounter πρέπει να φυλάσσονται στους ή κάτω από τους -20°C.
- Τα Prep plates (Πλακίδια Prep) nCounter πρέπει να φυλάσσονται στους 4°C (2-8°C).
- Τα στοιχεία του Prep Pack (Πακέτου Prep) nCounter πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου 15°C–25°C.

9 ΟΡΓΑΝΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ PROSIGNA

- Σύστημα ανάλυσης nCounter (Κωδικός καταλόγου NCT-SYST-DX) (περιλαμβάνει και τα δύο παρακάτω όργανα)
 - Σταθμός Prep nCounter 5s (Κωδικός καταλόγου NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - Ψηφιακός αναλυτής nCounter 5s (Κωδικός καταλόγου NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος ανάλυσης nCounter.

10 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

10.1 Υλικά

- Kit απομόνωσης RNA από FFPE (βλ. Ενότητα 11.5 για τις απαιτήσεις των kit απομόνωσης, εάν δεν χρησιμοποιείτε το kit απομόνωσης RNA από FFPE της Roche ή το kit εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte που πωλείται μέσω της Veracyte)
- Αιματοξυλίνη και Ιωσίνη (H&E)
- Θετικά φορτισμένες υάλινες πλάκες μικροσκοπίου
- Καθαριστικός παράγοντας D-Λιμονένιου (ιστολογικής ποιότητας)
- 100% Αιθανόλη (Απόλυτη), ποιότητας ACS ή ισοδύναμης (όχι κάτω από 99,5%)
- Γλυκερόλη, ποιότητας μοριακής βιολογίας
- Νερό χωρίς νουκλεάση, ποιότητας μοριακής βιολογίας¹⁻²
- 10% SDS, ποιότητας μοριακής βιολογίας¹
- 100% ισοπροπανόλη²
- Κωνικό σωληνάριο 50 mL²
- Ξυριστικές λεπίδες (ή αναλώσιμα νυστέρια)
- Αναλώσιμες λεπίδες μικροτόμου
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης χωρίς Ριβονουκλεάση με βιδωτό πώμα¹ 0,5 mL και αντικολητικά 1,5 ή 1,7 mL
- Ρύγχη μικροπιπέτας χωρίς Ριβονουκλεάση με φραγμό αερολυμάτων

¹ Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται για την εκχύλιση RNA με τη χρήση του kit απομόνωσης RNA από FFPE της Roche.

² Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται για την εκχύλιση RNA με τη χρήση του kit εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte και αναφέρονται επίσης στις οδηγίες χρήσης του kit Veracyte.

10.2 Εξοπλισμός

- Μικροτόμος
- Υδατόλουτρο (40°C)
- Θερμαντήρας πλακιδίων (45°C)
- Στατώ στεγνώματος πλάκας μικροσκοπίου
- Μικροπιπέτες, 2 μL, 20 μL, 200 μL και 1000 μL
- Μινι-φυγοκεντρική με ρότορα σειράς σωληναρίων 0,2 mL και τυπικό ρότορα σωληναρίων μικροφυγοκέντρωτη 1,5/2,0 mL
- Τυπικός επιτραπέζιος μικρο-φυγοκεντρική με ρότορα σταθερής γωνίας, κατάλληλος για σωληνάρια φυγοκέντρωσης 1,5 mL
- Ορθογώνια υάλινα τρυβλία χρώσης με καλύμματα (κατά προσέγγιση εσωτερικές διαστάσεις 3,6 × 2,8 × 2,4" (91 × 71 × 60 mm)), η απαιτούμενη ποσότητα είναι 3
- Στατώ πλακιδίων (συγκρατεί έως δέκα υάλινα πλακίδια 3" × 1" (75 × 25 mm))
- Ξηρό συγκρότημα θέρμανσης, στάσιμο*
- Επιτραπέζιος αναδευτήρας για σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης
- Διαβαθμισμένος κύλινδρος (πρωτεϊνόμενο μέγεθος: 100-250 mL)
- Βελόνα εκτομής με πλαστική λαβή ή λαβίδα καλυπτριάς (γωνιώδης, μη πριονωτή)
- Βαθμονομημένα θερμόμετρα (που καλύπτουν το εύρος από 55°C έως 80°C)
- Φασματοφωτόμετρο μικρο-όγκου UV/Vis (βλ. προδιαγραφές παρακάτω)
- Συγκρότημα θέρμανσης με θερμαινόμενο καπάκι (βλ. προδιαγραφές παρακάτω)
- Φυγοκεντρική με προσαρμογέα μικροπλάκας (βλ. προδιαγραφές παρακάτω)
- Δοχείο τύπου Corlin

*Εξοπλισμός που απαιτείται για την εκχύλιση RNA με το kit απομόνωσης RNA από FFPE της Roche και το kit εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte.

10.3 Προδιαγραφές εξοπλισμού

Πίνακας 1: Φασματοφωτόμετρο μικρο-όγκου UV/Vis πλήρους φάσματος για ποσοτικοποίηση νουκλεϊνικών οξέων

Χαρακτηριστικό σχεδίασης	Προδιαγραφές
Εύρος όγκου δείγματος	1-2 μL
Μήκος διαδρομής	1 mm
Εύρος μήκους κύματος	260-280 nm
Ορθότητα ή σφάλμα μήκους κύματος	± 1 nm
Φασματική ανάλυση ή εύρος ζώνης	Μικρότερη από ή ίση με 4 nm
Ακρίβεια απορρόφησης ή τυχαίο φωτομετρικό σφάλμα	0,003 (διαδρομή 1 mm)
Όριο ανίχνευσης	5 ng/μL RNA
Μέγιστη συγκέντρωση	≥ 1000 ng/μL RNA

Πίνακας 2: Φασματοφωτόμετρο φωτοδιόδου μικροόγκου UV/Vis για ποσοτικοποίηση νουκλεϊνικών οξέων

Χαρακτηριστικό σχεδίασης	Προδιαγραφές
Εύρος όγκου δείγματος	1-2 µL
Μήκος διαδρομής	0,5 mm
Εύρος μήκους κύματος	260 και 280 nm
Φασματική ανάλυση	Μικρότερη από ή ίση με 8 nm
Ορθότητα απορρόφησης	3% (στα 1,05 Abs στα 260 nm)
Όριο ανίχνευσης	4 ng/µL RNA
Μέγιστη συγκέντρωση	≥ 1000 ng/µL RNA

Πίνακας 3: Συγκροτήμα θερµανσης με θερµαινόμενο καπάκι για υβριδοποίηση προσδιορισµού

Χαρακτηριστικό σχεδίασης	Προδιαγραφές
Σχεδίαση συγκροτήματος θερµανσης	<ul style="list-style-type: none"> Πρέπει να είναι κατάλληλο για 12 x 0,2 mL σηµασµένες σειρές σωληναρίων κανονικού προφίλ που παρέχονται ως τμήμα του Πακέτου Prep nCounter. Τα συγκροτήματα θερµανσης που έχουν σχεδιαστεί για σωληνάρια χαµηλού προφίλ (LP) και υψηλού προφίλ (HP) δεν είναι συμβατά (επίσης αναφέρονται ως «ταχεία» συγκροτήματα για θερµοκύκλωση) Τα συγκροτήματα θερµανσης που έχουν σχεδιαστεί για άλλους τύπους σωληναρίων (π.χ. σωληνάρια 0,1 mL, σωληνάρια 1,5 mL) δεν είναι συμβατά Πρέπει να προγραµµατίζεται για διατήρηση σε θερµοκρασία 65°C Πρέπει να διατηρεί τη θερµοκρασία από ±1°C έως 65°C
Σχεδίαση θερµαινόμενου καπακιού	<ul style="list-style-type: none"> Είναι αποδεκτά τα καπάκια σταθερού ή µεταβλητού ύψους Το καπάκι πρέπει να προγραµµατίζεται στους 70°C

Πίνακας 4: Φυγοκεντρικές με φορέα μικροπλακών για την περιστροφή των Πλακιδίων Prep nCounter

Χαρακτηριστικό σχεδίασης	Προδιαγραφές
Ταχύτητα φυγοκεντρικής	Τουλάχιστον 2000 x g
Ρότορες	4 x 750 mL ρότορες περιστρεφόμενου κάδου με φορείς μικροπλακών (ή ισοδύναμο) για μικροπλάκες τύπου SBS 96 φρεατίων
Τρόποι λειτουργίας	Τρόποι επιτάχυνσης/επιβράδυνσης

11 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

11.1 Ανασκόπηση απαιτήσεων και παθολογίας δειγμάτων ιστού

- Ο Προσδιορισμός γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna πρέπει να διεξάγεται σε δείγμα ιστού με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE) που έχει επιπλέον καθοριστεί από παθολογοανατόμο ως ένας από τους ακόλουθους τύπους διηθητικού καρκινώματος του μαστού:
 - Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα
 - Διηθητικό ενδολοβιακό καρκίνωμα
 - Διηθητικό καρκίνωμα με πορογενή και ενδολοβιακά χαρακτηριστικά («καρκίνωμα μικτού τύπου»)
 - Μη ειδικού τύπου (NST) ή μη καθοριζόμενο αλλιώς (NOS)
- Ένας παθολογοανατόμος πρέπει να επιλέξει το μπλοκ όγκου FFPE με τη μεγαλύτερη επιφάνεια ζωτικού διηθητικού καρκινώματος του μαστού για αυτή τη δοκιμασία.
- Η δοκιμασία απαιτεί τομές ιστού σε μη χρωσμένα πλακίδια για επεξεργασία και αντίστοιχο, χρωσμένο με H&E πλακίδιο από το μπλοκ όγκου FFPE.
- Συνιστάται οι τομές ιστού για την επεξεργασία του προσδιορισμού να κόβονται παρακείμενα στην τομή ιστού για τη χρώση με H&E, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι η επιφάνεια του όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο είναι αντιπροσωπευτική του εμβადού επιφάνειας του όγκου στα μη χρωσμένα πλακίδια.
- Ένας παθολογοανατόμος πρέπει να κυκλώσει την περιοχή ζωτικού διηθητικού καρκινώματος του μαστού στο πλακίδιο H&E, εξαιρώντας τον περιβάλλοντα μη καρκινικό ιστό.
- Ένας παθολογοανατόμος ή εκπαιδευμένος τεχνικός του εργαστηρίου πρέπει να εκτιμήσει την κυτταροβρίθεια και το εμβαδόν επιφάνειας του όγκου εντός της κυκλωμένης περιοχής του χρωσμένου με H&E πλακιδίου.
 - Το ποσοστό κυτταροβρίθειας του όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο πρέπει να είναι ≥ 10%
 - Η κυκλωμένη περιοχή επιφάνειας όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο πρέπει να είναι ≥ 4 mm²

*Έχετε υπόψη ότι το ποσοστό κυτταροβρίθειας του όγκου αναφέρεται στο ποσοστό των βιώσιμων καρκινικών κυττάρων εντός της κυκλωμένης περιοχής όγκου.
- Συνιστάται συνολικό εμβαδόν επιφάνειας όγκου μεγαλύτερο από 100 mm² ως προϋπόθεση για τη δοκιμασία. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται ο αριθμός των συνιστώμενων πλακιδίων με βάση το μετρηθέν εμβαδόν επιφάνειας όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο.

- Αν η διαδικασία ανασκόπησης ιστού δείξει ότι το μπλοκ όγκου έχει ανεπαρκή επιφάνεια όγκου ή ανεπαρκή κυτταροβρίθεια όγκου, τότε πρέπει να αξιολογηθεί ένα διαφορετικό μπλοκ από τον ίδιο όγκο. Αν δεν υπάρχουν μπλοκ FFPE με επαρκή καρκινικό ιστό, δεν πρέπει να εκτελεστεί ο Προσδιορισμός Prosigna. Έχετε υπόψη ότι για όγκους με εμβαδόν επιφάνειας μικρότερο από 20 mm², είναι πιθανότερο να μην πληρούνται οι απαιτήσεις εισόδου RNA.

Πίνακας 5: Συνιστώμενες απαιτήσεις πλακιδίων με βάση το εμβαδόν επιφάνειας του όγκου

Μετρηθέν εμβαδόν επιφάνειας όγκου στο χρωσμένο με H&E πλακίδιο (mm ²)	Αριθμός μη χρωσμένων πλακιδίων
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων

- Οι παρακάτω εργασίες μπορούν να διεξαχθούν σύμφωνα με τις τυπικές διαδικασίες χειρισμού του εργαστηρίου: συλλογή ιστού και μονιμοποίησή του σε φορμόλη, χειρισμός και φύλαξη μπλοκ όγκου FFPE και αποστολή ιστού FFPE πάνω σε πλακίδιο.
- Οι τομές ιστού FFPE που είναι τοποθετημένες σε πλακίδιο πρέπει να φυλάσσονται σύμφωνα με τις τυπικές διαδικασίες χειρισμού του εργαστηρίου. Αν η φύλαξη προορίζεται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (> 30 ημέρες), τα πλακίδια πρέπει να φυλάσσονται σε αφυδατωμένο περιβάλλον και να υποβάλλονται σε επεξεργασία εντός 9 μηνών, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ποιότητα των αποτελεσμάτων από τη δοκιμασία.

11.3 Παρασκευή πλακιδίων

- Using a microtome, cut aME έναν μικροτόμο, κόψτε μια τομή πάχους 4–5 µm για χρώση H&E.
- Με έναν μικροτόμο, κόψτε μια τομή πάχους 10 µm για χρήση στον Προσδιορισμό Prosigna.
- Τοποθετήστε τις τομές σε επίπλευση μέσα σε υδατόλουτρο στους 40°C.
- Τοποθετήστε τις τομές πάνω σε θετικά φορτισμένες υάλινες πλάκες μικροσκοπίου.
- Αφήστε τις πλάκες να στεγνώσουν στον αέρα.
- Ψήστε τα πλακίδια όλη τη νύχτα στους 45°C.

11.4 Επεξεργασία πλακιδίων

- Παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας γλυκερόλης 3% αναμειγνύοντας 1,5 mL αποθέματος γλυκερόλης με 48,5 mL ύδατος μοριακής ποιότητας και χωρίς νουκλεάση. Μπορείτε να προσαρμόσετε την κλίμακα όπως απαιτείται. Χύστε το διάλυμα μέσα σε ένα δοχείο τύπου Corlin για την επεξεργασία των πλακιδίων.
- Χύστε περίπου 200–250 mL καθαριστικό παράγοντα D-Λιμονένιου σε δύο τρυβλία χρώσης, διασφαλίζοντας ότι τα πλακίδια στο στατώ πλακιδίων είναι πλήρως εμβυθισμένα.
- Χύστε περίπου 200–250 mL απόλυτης Αιθανόλης (EtOH) σε ένα τρίτο τρυβλίο χρώσης.
- Τοποθετήστε τη μη χρωσμένη τομή ιστού στο πλακίδιο σε ένα στατώ πλακιδίων.
- Τοποθετήστε το στατώ πλακιδίων στο πρώτο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου και αναδεύστε απαλά το στατώ πλακιδίων με κινήσεις εμπρός - πίσω για 10–15 δευτερόλεπτα. Αφήστε το στατώ μέσα στο πρώτο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου για συνολικό χρόνο 2 λεπτών.
- Μετακινήστε το στατώ πλακιδίων από το πρώτο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου στο δεύτερο τρυβλίο D-Λιμονένιου. Αναδεύστε απαλά το στατώ πλακιδίων με κινήσεις εμπρός - πίσω για 10–15 δευτερόλεπτα. Αφήστε το στατώ πλακιδίων μέσα στο δεύτερο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου για συνολικό χρόνο 2 λεπτών. Βεβαιωθείτε ότι έχει απομακρυνθεί όλη η παραφίνη. Διαφορετικά, αφήστε το στατώ στο δεύτερο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου και αφαιρέστε το μετά από 2 λεπτά.
- Μετακινήστε το στατώ πλακιδίων από το δεύτερο τρυβλίο χρώσης D-Λιμονένιου στο διάλυμα πλύσης EtOH. Αναδεύστε απαλά το στατώ πλακιδίων με κινήσεις εμπρός - πίσω για 10–15 δευτερόλεπτα και αφαιρέστε το μετά από 2 λεπτά.
- Αφήστε τα πλακίδια να στεγνώσουν στον αέρα για 5–10 λεπτά ή μέχρι να στεγνώσουν τελείως και ο ιστός να φαίνεται λευκός (αυτό μπορεί να διαρκέσει περισσότερο ανάλογα με το μέγεθος του ιστού).
- Πλαισιώστε την περιοχή του όγκου στην πίσω πλευρά των μη χρωσμένων πλακιδίων ευθυγραμμίζοντάς το με το αντίστοιχο, χρωσμένο με H&E πλακίδιο και αντιμεταθέτοντας την πλαισιωμένη περιοχή.
- Εργαζόμενοι με ένα πλακίδιο κάθε φορά, ενυδατώστε εκ νέου τον ιστό στο πλαισιωμένο μη χρωσμένο πλακίδιο εμβυθίζοντας το πλακίδιο στο διάλυμα γλυκερόλης 3%.
- Αφαιρέστε τυχόν περίσσεια γλυκερόλη από το πλακίδιο με ένα μαντηλάκι εργαστηριακής χρήσης.
- Κατά την επεξεργασία πολλών πλακιδίων, ο χρήστης μπορεί να αφήσει τα πλακίδια να στεγνώσουν σε ένα στατώ στεγνώματος, ενώ ενυδατώνει εκ νέου τα άλλα πλακίδια.
- Αποξύνετε τυχόν μη καρκινικό ιστό που περιβάλλει την πλαισιωμένη καρκινική περιοχή με μια ξυριστική λεπίδα ή νυστέρι και απορριψίτε.
- Κρατώντας το ένα άκρο του πλακιδίου και ακουμπώντας το άλλο άκρο σε μια στερεή επιφάνεια υπό γωνία 45 μοιρών, συλλέξτε τον καρκινικό ιστό που υποβάλλετε σε μακροεκτομή στην αιχμή μιας ξυριστικής λεπίδας. Ο ιστός πρέπει να «υψιλείται» εύκολα πάνω στην ξυριστική λεπίδα καθώς συλλέγεται.

- Επαναλάβετε το προηγούμενο βήμα για κάθε πλακίδιο από το ίδιο δείγμα.
Σημείωση: Μπορείτε να συλλέξετε πολλά μη χρωσμένα πλακίδια από ένα δείγμα FFPE στην ίδια ξυριστική λεπίδα.
- Σύρετε απαλά τις τομές ιστού από το ίδιο δείγμα σε ένα σημιασμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5 mL.
- Αν χρησιμοποιείται βελόνα εκτομής ή λαβίδα, καθαρίστε την με εμβύθισή της σε D-Λιμονένιο για λίγα δευτερόλεπτα και στέγνωμα μεταξύ των ιστικών δειγμάτων.

11.5 Απομόνωση του RNA

Η Veracyte συνιστά τη χρήση του κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche ή του κιτ εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte, των οποίων η χρήση έχει επικυρωθεί ειδικά με το Prosigna.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κιτ απομόνωσης RNA για την παρασκευή δειγμάτων για το Prosigna, εάν παράγουν το RNA από τομές ιστού καρκίνου του μαστού FFPE, τοποθετημένες πάνω σε πλακίδιο που πληρούν τις ακόλουθες προδιαγραφές:

Πίνακας 6: Προδιαγραφές του κιτ απομόνωσης RNA

Μετρικός παράγοντας	Δοκιμασία ή μέτρηση	Προδιαγραφή
Συγκέντρωση RNA	Οπτική πυκνότητα στα 260 nm	≥ 12,5 ng/μL
Ολικός όγκος RNA (μL)	Ολικός εκπιλόμενος όγκος	> 12 μL
Καθαρότητα RNA	Αναλογία οπτικής πυκνότητας στα 260 nm προς οπτική πυκνότητα στα 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
Μόλυση DNA	Γενωμικό περιεχόμενο DNA εκπιλόμενου δείγματος RNA	≤ 1 ng/μL
Ακεραιότητα RNA	Κατανομή μεγέθους απομονωμένων τμημάτων RNA	≥ 90% των απομονωμένων τμημάτων RNA πρέπει να έχουν μήκος > 100 νουκλεοτιδία

Προσοχή: Εάν χρησιμοποιείται μια εναλλακτική διαδικασία απομόνωσης σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό Prosigna, η συγκεκριμένη ροή εργασιών πρέπει να επικυρωθεί πλήρως από το εργαστήριο προτού εφαρμοστεί στη συνήθη πρακτική.

Διαδικασία απομόνωσης RNA:

- Εάν χρησιμοποιείται το κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche, ακολουθήστε τις ειδικές οδηγίες για την απομόνωση RNA που περιγράφονται παρακάτω.

- Εάν χρησιμοποιείται το κιτ εκχύλισης RNA από FFPE της Veracyte, ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται από τη Veracyte και κατόπιν συνεχίστε στην ενότητα 11.6.

- Εάν χρησιμοποιείται εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης, ακολουθήστε το επικυρωμένο πρωτόκολλο ή το πρωτόκολλο που παρέχεται από τον κατασκευαστή και κατόπιν συνεχίστε στην ενότητα 11.6.

Κάθε παρτίδα κιτ εκχύλισης RNA που κατασκευάζεται από τη Roche ή τη Veracyte είναι κατάλληλη για την παραγωγή δειγμάτων RNA που πληρούν προκαθορισμένες προδιαγραφές για διαγνωστικούς προσδιορισμούς γονιδιακής έκφρασης. Παρακαλείστε να ανατρέξετε στο φύλλο μεθόδου/στις οδηγίες χρήσης του επιλεγμένου κιτ εκχύλισης RNA για τις κατάλληλες οδηγίες αποθήκευσης, ασφάλειας και χειρισμού.

Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας για το κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche

- Παρασκευάστε διαλύματα εργασίας, προτού συνεχίσετε με την αφομοίωση του ιστού και την απομόνωση του RNA:

Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	
Αντιδραστήριο	Διαδικασία
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης I (WB1)*	Προσθέστε 15 mL Αιθανόλης 100%, φυλάξτε το παρασκευασμένο WB1 στους +15 έως +25°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης II (WB2)*	Προσθέστε 80 mL Αιθανόλης 100%, φυλάξτε το παρασκευασμένο WB1 στους +15 έως +25°C.
Πρωτεΐνωση K (PK)	Διαλύστε την Πρωτεΐνωση K σε υδρόφιλη μορφή σε 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος παρασκευής αντιδραστήριου (RPB). Παρασκευάστε κλάσματα των 600 μL, σημάνετε και φυλάξτε τα κλάσματα στους -15 έως -25°C.
DNase I (DNase I)*	Διαλύστε την DNase I σε υδρόφιλη μορφή σε 740 μL ρυθμιστικού διαλύματος παρασκευής αντιδραστήριου (RPB). Παρασκευάστε κλάσματα των 50 μL, σημάνετε και φυλάξτε τα κλάσματα στους -15 έως -25°C.

Σημείωση: Τα στοιχεία που επισημαίνονται με αστερίσκο (*) δεν απαιτούνται μέχρι την αφομοίωση του ιστού.

Αφομοίωση ιστού για το κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche

- Ξεπαγώστε επαρκή αριθμό κλασμάτων Πρωτεΐνωσης K (PK). Αφού ξεπαγώσετε τα κλάσματα, φυλάξτε τα στον πάγο μέχρι να τα χρησιμοποιήσετε.
Σημείωση: Το ένα κλάσμα PK 600 μL περιέχει επαρκή Πρωτεΐνωση K για 4 αφομοιώσεις ιστού.
- Προσθέστε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ιστού (TLB), 16 μL 10% SDS και 120 μL διαλύματος εργασίας Πρωτεΐνωσης K στα σωληνάρια δειγμάτων με ιστό.
- Αναδεύστε τα σωληνάρια δειγμάτων για αρκετά δευτερόλεπτα και ελαττώστε ταχύτητα για λίγο.
- Επιβάστε στους 55°C για όλη τη νύχτα (12 ώρες – 23 ώρες).

Απομόνωση RNA για το κιτ απομόνωσης RNA από FFPE της Roche

- Ελέγξτε οπτικά τα σωληνάρια δείγματος, για να διαπιστώσετε εάν ο ιστός έχει αφομοιωθεί πλήρως. Η πλήρης αφομοίωση θα φαίνεται διαφανής και θα έχει μηδαμινό έως καθόλου ιστό στο διάλυμα.
 - Αν έχει ολοκληρωθεί η αφομοίωση, συνεχίστε στο επόμενο βήμα.
 - Αν δεν έχει ολοκληρωθεί η αφομοίωση, προσθέστε επιπλέον 20 μL Πρωτεΐνωσης K και επώαστε για άλλη μία ώρα.
- Περιδινύστε όλα τα δείγματα (< 30 δευτερόλεπτα σε μινι-φυγοκεντρωτή).
- Επιβάστε τα δείγματα στους 80°C για 15 λεπτά.
- Παρασκευάστε ή ξεπαγώστε επαρκή αριθμό κλασμάτων Δεοξυριβονουκλεάσης (DNase). Αφού ξεπαγώσετε τα κλάσματα, φυλάξτε τα στον πάγο μέχρι να τα χρησιμοποιήσετε.
Σημείωση: Το ένα κλάσμα 50 μL DNase περιέχει επαρκή Δεοξυριβονουκλεάση για 4 διαδικασίες απομόνωσης RNA.
- Αραιώστε τη Δεοξυριβονουκλεάση σε ρυθμιστικό διάλυμα επώασης Δεοξυριβονουκλεάσης (DIB). Η απαιτούμενη ποσότητα για N (αριθμός) διαδικασίες απομόνωσης RNA είναι: (N+1) × 90 μL Ρυθμιστικού διαλύματος επώασης Δεοξυριβονουκλεάσης + (N+1) × 10 μL Δεοξυριβονουκλεάσης. Φυλάξτε το αραιωμένο διάλυμα Δεοξυριβονουκλεάσης στον πάγο μέχρι να το χρησιμοποιήσετε.
- Προσθέστε 325 μL Ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης παραφίνης (PBB) και 325 μL απόλυτης Αιθανόλης σε κάθε δείγμα και αναδεύστε με μεταφορά με πιπέτα.
- Ελαττώστε ταχύτητα για λίγο (< 30 δευτερόλεπτα σε μινι-φυγοκεντρωτή).
- Τοποθετήστε ένα σωληνάριο υπερκαθαρού φίλτρου σε ένα υπερκαθαρό σωληνάριο συλλογής.
- Μεταφέρετε το δείγμα με πιπέτα στο άνω δοχείο του σωληναρίου φίλτρου αποφεύγοντας τυχόν εναπομείναντα ιστό.
- Φυγοκεντρίστε για 30 δευτερόλεπτα στα 6.000 × g.
- Τοποθετήστε το σωληνάριο υπερκαθαρού φίλτρου σε ένα νέο υπερκαθαρό σωληνάριο συλλογής (απορρίψτε το προηγούμενο σωληνάριο συλλογής που περιέχει τη ροή).
- Φυγοκεντρίστε για 2 λεπτά στα 16.000 × g για να στεγνώσετε πλήρως τη μάλλινη επένδυση του φίλτρου.
- Τοποθετήστε το σωληνάριο υπερκαθαρού φίλτρου σε ένα νέο υπερκαθαρό σωληνάριο συλλογής (απορρίψτε το προηγούμενο σωληνάριο συλλογής που περιέχει τη ροή).
- Προσθέστε 100 μL διαλύματος εργασίας Δεοξυριβονουκλεάσης στη μάλλινη επένδυση του φίλτρου του σωληναρίου υπερκαθαρού φίλτρου και επιβάστε για 15 λεπτά στους +15 έως +25°C.
- Προσθέστε 500 μL διαλύματος εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης I (WB1) στη μάλλινη επένδυση του υπερκαθαρού φίλτρου, φυγοκεντρίστε για 20-30 δευτερόλεπτα στα 6.000 × g, απορρίψτε τη ροή.
- Προσθέστε 500 μL διαλύματος εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης I (WB1) στη μάλλινη επένδυση του υπερκαθαρού φίλτρου, φυγοκεντρίστε για 20-30 δευτερόλεπτα στα 6.000 × g, απορρίψτε τη ροή.
- Προσθέστε 500 μL διαλύματος εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης I (WB1) στη μάλλινη επένδυση του υπερκαθαρού φίλτρου, φυγοκεντρίστε για 20-30 δευτερόλεπτα στα 6.000 × g, απορρίψτε τη ροή.
- Φυγοκεντρίστε για 2 λεπτά στα 16.000 × g για να στεγνώσετε πλήρως τη μάλλινη επένδυση του φίλτρου.
- Τοποθετήστε το σωληνάριο υπερκαθαρού φίλτρου σε ένα σημιασμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5 ή 1,7 mL που δεν περιέχει Ριβονουκλεάση.
- Προσθέστε 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος εκλούσεως (EB) στο κέντρο της μάλλινης επένδυσης του υπερκαθαρού φίλτρου.
- Επιβάστε για 1 λεπτό στους +15 έως +25°C.
- Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό στα 6.000 × g για να εκλούσετε το RNA από τη στήλη. Αφαιρέστε και απορρίψτε το σωληνάριο υπερκαθαρού φίλτρου.
- Φυγοκεντρίστε το RNA που εκλούστηκε στο σωληνάριο μικροφυγοκεντρωτή για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό σε ένα σωληνάριο 0,5 mL με βιδωτό πώμα (χωρίς να διαταράξετε τυχόν υάλινες ίνες που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί από την έκπλυση της μάλλινης επένδυσης του φίλτρου στον πυθμένα στο αρχικό σωληνάριο).

11.6 Μέτρηση της συγκέντρωσης και της ποιότητας RNA

- Μετρήστε τη συγκέντρωση του απομονωμένου RNA την ίδια εργάσιμη ημέρα (φυλάξτε το στους +2 έως +8°C) ή καταψύξτε το στους -70°C και κάτω μέχρι να το χρησιμοποιήσετε.
- Μετρήστε την οπτική πυκνότητα (OD) στα 260 και 280 nm σε 2 μL απομονωμένου RNA χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο που πληροί τις καθορισμένες προδιαγραφές που αναφέρονται στην Ενότητα 10.3 Προδιαγραφές εξοπλισμού. Αποφύγετε να λάβετε μέσω πιπέτας τον όγκο 2 μL από τον πυθμένα του αρχικού σωληναρίου, καθώς μπορεί να εναπομείνουν υάλινες ίνες που μπορεί να προκαλέσουν παρεμβολές στην ένδειξη οπτικής πυκνότητας.
- Για τη μέτρηση του RNA, ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή του φασματοφωτόμετρου.
- Αν κάποιο δείγμα δεν πληροί τα μετρικά μεγέθη καθαρότητας ή συγκέντρωσης RNA (Πίνακας 6), φυγοκεντρίστε το σωληνάριο δείγματος για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (> 10.000 × g), τοποθετήστε το σωληνάριο σε πάγο και επαναλάβετε τη διαδικασία μέτρησης. Αν το δείγμα συνεχίζει να μην πληροί τα μετρικά μεγέθη καθαρότητας ή συγκέντρωσης, το δείγμα RNA δεν

είναι κατάλληλο για ανάλυση με τη διαδικασία Προσδιορισμού Prosigna. Μην χρησιμοποιείτε RNA ανεπαρκούς ποιότητας ή ποσότητας στον Προσδιορισμό Prosigna.

5. Η εξαγωγή RNA μπορεί να επαναληφθεί, εάν δεν πληρούνται οι ελάχιστες προδιαγραφές συγκέντρωσης ή καθαρότητας (Πίνακας 6). Οι χρήστες μπορούν να επιλέξουν να απομονώσουν πρόσθετα πλακίδια από το ίδιο συγκρότημα FFPE ή να επιλέξουν ξεχωριστό συγκρότημα από τον ίδιο ασθενή.
6. Αν η συγκέντρωση RNA υπερβαίνει τα 250 ng/μL, πρέπει να αραιωθεί με νερό μοριακής ποιότητας που δεν περιέχει Ριβονουκλεάση και Δεοξυριβονουκλεάση ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 200 ng/μL πριν τη διεξαγωγή του προσδιορισμού καθοδικού υβριδισμού. Χρησιμοποιήστε το αποτέλεσμα της αναλογίας OD 260/280 που καταγράψατε από το μη αραιωμένο δείγμα, για να καθορίσετε εάν το αραιωμένο δείγμα πληροί την ελάχιστη καθαρότητα RNA 1,7.
7. Καταψύξτε το RNA στους -70°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία, εάν δεν μπορείτε να ολοκληρώσετε τον Προσδιορισμό Prosigna την ίδια εργάσιμη ημέρα.

11.7 Διαδικασία προσδιορισμού

Αυτή η διαδικασία προσδιορισμού περιγράφει τα βήματα που απαιτούνται για τη διεξαγωγή του Προσδιορισμού Prosigna με τη χρήση του Συστήματος ανάλυσης nCounter. Αυτά τα βήματα μπορούν να συνοψιστούν στις ακόλουθες κατηγορίες σε δύο διαδοχικές ημέρες:

Πρώτη ημέρα

- Ρύθμιση του αρχείου «Run Set Identification» (Ταυτοποίηση σειράς αναλύσεων) (RSID) στην εφαρμογή web
- Ρύθμιση υβριδοποίησης RNA με το Prosigna CodeSet (ρύθμιση 30 λεπτά, υβριδοποίηση 15-21 ώρες)

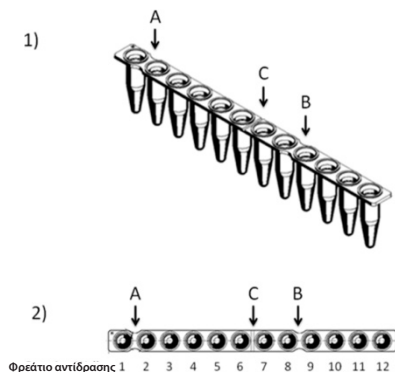
Δεύτερη ημέρα

- Ρύθμιση και λειτουργία του Σταθμού Prep (20 λεπτά ρύθμιση, 2-3 ώρες ανά ανάλυση, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων για ανάλυση)
- Ρύθμιση και σάρωση της Φύσιγγας στον Ψηφιακό αναλυτή (5 λεπτά ρύθμιση, 2,5-4,5 ώρες για κάθε Φύσιγγα, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων για ανάλυση)
- Ανάκτηση αναφοράς (30 λεπτά)

Επιλογή δείγματος ασθενούς και ρύθμιση παρτίδας

8. Καθορίστε τα δείγματα ασθενούς που θα αποτελέσουν τμήμα της ανάλυσης. Μπορούν να συμπεριληφθούν έως 10 δείγματα σε μία παρτίδα
 - α. Σε κάθε δείγμα της παρτίδας θα εκχωρηθεί μια μοναδική θέση στη σειρά σωληναρίων 12 φρεατίων που θα χρησιμοποιηθεί για την υβριδοποίηση, η οποία καταχωρίζεται ως τμήμα του Αναγνωριστικού σειράς αναλύσεων στο όργανο (Το Αναγνωριστικό σειράς αναλύσεων πραγματοποιείται μέσω του λογισμικού της εφαρμογής web). Έχετε υπόψη ότι οι θέσεις 1 και 2 είναι κρατημένες για το Δείγμα Αναφοράς και οι θέσεις 3-12 προορίζονται για δείγματα RNA όγκου.
 - β. Η παρακάτω εικόνα δείχνει την πλαιϊνή 1) και επάνω όψη 2) της σειράς σωληναρίων. Οι σειρές σωληναρίων φέρουν ασύμμετρη σήμανση μεταξύ των φρεατίων αντίδρασης 1 και 2 (A) και 8 και 9 (B) ώστε να διατηρείται η σειρά των δειγμάτων κατά την επεξεργασία. Οι σειρές σωληναρίων φέρουν επίσης εγκοπές μεταξύ των φρεατίων αντίδρασης 6 και 7 (C) για τη διευκόλυνση της κοπής της σειράς σωληναρίων, εάν είναι απαραίτητη για τη σύνδεση τυπικών προσαρμογών φυγοκεντρωτή.

Εικόνα 6: Απεικόνιση σημασμένης σειράς σωληναρίων



9. Υπολογίστε την ποσότητα RNA και νερού (όταν απαιτείται) που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση υβριδοποίησης για κάθε δείγμα της παρτίδας.
 - α. Η συνιστώμενη είσοδος RNA είναι 250 ng για τον προσδιορισμό. Το αποδεκτό εύρος εισόδου RNA για την υβριδοποίηση είναι 125-500 ng.

- β. Υπολογίστε τον όγκο (σε μικρολίτρα) του δείγματος RNA που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση υβριδοποίησης διαιρώντας την επιθυμητή είσοδο δείγματος (π.χ. 250 ng) με τη μετρηθείσα συγκέντρωση.
- γ. Αν η υπολογιζόμενη συγκέντρωση του δείγματος είναι μεταξύ 12,5 ng/μL και 25 ng/μL, προσθέστε μέγιστο όγκο 10 μL.
- δ. Για δείγματα που απαιτούν λιγότερο από 10 μL, υπολογίστε τον όγκο του νερού που απαιτείται για την παραγωγή συνολικού όγκου δείγματος 10 μL.

Παράδειγμα: Για δείγμα με μετρηθείσα συγκέντρωση RNA 85 ng/μL, απαιτούνται 2,9 μL δείγματος για συνολική μάζα 250 ng και 7,1 μL νερού για να ληφθεί όγκος 10 μL πριν την προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστήριων. Σε εξίσωση: 250 ng ÷ 85 ng/μL = 2,9 μL

Κατάχωση και επεξεργασία δείγματος

Ο χρήστης θα δημιουργήσει ένα μοναδικό αναγνωριστικό σειράς αναλύσεων για κάθε παρτίδα δειγμάτων σχετιζοντας τα αναγνωριστικά δείγματα με τη θέση του σωληναρίου στη σειρά σωληναρίων (θέσεις 3-12) χρησιμοποιώντας την εφαρμογή web «Services» (Υπηρεσίες) του Συστήματος ανάλυσης nCounter. Για οδηγίες σχετικά με τη χρήση της εφαρμογής web «Services» (Υπηρεσίες) του Συστήματος ανάλυσης Counter, ο χρήστης μπορεί να ανατρέξει στο Εγχειρίδιο χρήσης.

1. Αν το RNA ήταν κατεψυγμένο πριν τη χρήση, εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα προτού συνεχίσετε:
 - α. Ξεπαγώστε τελείως τα δείγματα RNA και φυλάξτε τα σε πάγο.
 - β. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο δείγματος που ξεπαγώσατε για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (> 10.000 x g) και τοποθετήστε το ξανά σε πάγο.
2. Επιλέξτε το κατάλληλο κιτ δοκιμασιών Prosigna με βάση τον αριθμό των δειγμάτων ασθενούς που θα εξεταστούν (1, 2, 3, 4 ή 10). Αφαιρέστε ένα σωληνάριο για κάθε ένα από τα παρακάτω αντιδραστήρια του κιτ CodeSet από την κατάψυξη στους -80°C για να τα ξεπαγώσετε. Φυλάξτε τα αντιδραστήρια στον πάγο, εάν δεν πρόκειται να συνεχίσετε αμέσως στα επόμενα βήματα.
 - α. CodeSet Reporter (CodeSet αναφοράς) Prosigna (Πράσινο αυτοκόλλητο στο πώμα)
 - β. Capture ProbeSet (ProbeSet σύλληψης) Prosigna (Γκρι αυτοκόλλητο στο πώμα)
 - γ. Reference Sample (Δείγμα Αναφοράς) Prosigna (Χωρίς αυτοκόλλητο στο πώμα)
3. Αφαιρέστε το αυτοκόλλητο γραμμωτού κωδικού παρτίδας CodeSet και έναν κωδικό διαμόρφωσης δοκιμασίας από το κουτί του CodeSet.
4. Χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα περιήγησης στο web, συνδεθείτε στην εφαρμογή web του Συστήματος ανάλυσης IVD nCounter και επιλέξτε το Prosigna ως τύπο προσδιορισμού για να ξεκινήσετε τη διαμόρφωση των ψηφιακών φορμών καταχώρισης.
5. Στην κύρια οθόνη, επιλέξτε «Create New Run Set» (Δημιουργία νέας σειράς αναλύσεων).
6. Το πρώτο πεδίο που απαιτείται για τον ορισμό μιας ανάλυσης Prosigna είναι το «Run Set ID» (Αναγνωριστικό σειράς αναλύσεων). Εισαγάγετε ένα μοναδικό αναγνωριστικό στο πεδίο «Run Set ID» για να προσδιορίσετε την παρτίδα δειγμάτων.
7. Σαρώστε ή πληκτρολογήστε τον Κωδικό διαμόρφωσης δοκιμασίας στην εφαρμογή web. Μόλις τον σαρώσετε ή τον πληκτρολογήσετε, μπορείτε να τον απορρίψετε.
8. Σαρώστε ή πληκτρολογήστε τον Αριθμό κιτ CodeSet στην εφαρμογή web.
9. Στη συνέχεια, εισαγάγετε το μοναδικό αναγνωριστικό δείγματος για το δείγμα που θα τοποθετηθεί στην τρίτη θέση/φρεάτιο της σειράς σωληναρίων στο αντίστοιχο πεδίο αναγνωριστικού δείγματος.
 - α. Εισαγάγετε τα αναγνωριστικά δείγματος RNA χρησιμοποιώντας ένα σαρωτή γραμμωτού κωδικού ή χειροκίνητα, εισάγοντας τα αναγνωριστικά δείγματος με το πληκτρολόγιο.
 - β. Αφού εισαγάγετε κάθε αναγνωριστικό δείγματος, συμπληρώστε τα απαιτούμενα αναπτυσσόμενα πεδία (χονδρικό μέγεθος όγκου και κατάσταση λεμφαδένων) για το δείγμα, προτού εισαγάγετε πληροφορίες για το επόμενο δείγμα.
 - i. Χρησιμοποιήστε τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων που προσδιορίστηκαν κατά την παθολογοανατομική αξιολόγηση της ασθενούς, για να επιλέξετε την κατάλληλη κατηγορία κατάστασης λεμφαδένων για τη δοκιμασία (μηδέν, 1-3, >4).
 - ii. Χρησιμοποιήστε το μετρηθέν χονδρικό μέγεθος όγκου ή στάδιο που προσδιορίστηκε κατά την παθολογοανατομική αξιολόγηση της ασθενούς, για να επιλέξετε την κατηγορία μεγέθους όγκου για τη δοκιμασία (≤ 2 cm ή > 2 cm).
 - γ. Μπορείτε να εισαγάγετε σχόλια στο προαιρετικό πεδίο «Memo» (Σημείωμα) για κάθε δείγμα.
10. Αφού ολοκληρώσετε την εισαγωγή δειγμάτων, καθορίστε τους χρήστες που θα λαμβάνουν τα εξής:
 - α. Ενημερώσεις κατάστασης για τις αναλύσεις του Σταθμού Prep και του Ψηφιακού αναλυτή.

- β. Ειδοποίηση για τη διαθεσιμότητα της τελικής αναφοράς.
11. Αποθηκεύστε την ολοκληρωμένη σειρά αναλύσεων.
- α. Μπορείτε να εκτυπώσετε το φύλλο εργασίας της σειράς αναλύσεων, που χρησιμοποιείται για την ιχνηλασιμότητα και την επαλήθευση των δειγμάτων.

Διαδικασία αντίδρασης υβριδοποίησης

Σημείωση: Στα παρακάτω βήματα εκλαμβάνονται δέκα (10) δείγματα ασθενούς και δύο (2) δείγματα αναφοράς.

Σημείωση: Μην υποβάλλετε το CodeSet αναφοράς σε περιδίνηση με ταχύτητα μεγαλύτερη των $3.000 \times g$ ή για διάστημα μεγαλύτερο των 10 δευτερολέπτων και μην το «πάλτετε» για περιδίνηση. Με αυτόν τον τρόπο ο φυγοκεντρικός θα προσεγγίσει τη μέγιστη ταχύτητα και μπορεί να στροβιλίσει το CodeSet έξω από το δάλυμα.

1. Προγραμματίστε το συγκρότημα θέρμανσης χρησιμοποιώντας όγκο 30 μL , την υπολογιζόμενη θερμοκρασία του συγκροτήματος και του καπακιού και τη ρύθμιση του χρόνου «forever» (ή πάντα) (ή ισοδύναμη ρύθμιση χρόνου διατήρησης). Ορίστε τη θερμοκρασία του συγκροτήματος θέρμανσης στους 65°C και τη θερμοκρασία για το θερμαινόμενο καπάκι στους 70°C .

Σημείωση: Για τα παρακάτω βήματα, είναι σημαντικό να διατηρήσετε τη σειρά με την οποία έχουν προστεθεί τα δείγματα στη σειρά σωληναρίων, διασφαλίζοντας ότι ταιριάζουν με τη σειρά στο αναγνωριστικό σειράς αναλύσεων.

2. Σημάνετε την παρεχόμενη σημασμένη σειρά σωληναρίων 12 φρεατίων για να διακρίνετε τις θέσεις 1-6 από τις θέσεις 7-12 (βλ. εικόνα σειράς σωληναρίων).
3. Εάν είναι απαραίτητο, κόψτε τη σειρά σωληναρίων στη μέση, έτσι ώστε να μπορεί να προσαρμοστεί σε μινι-φυγοκεντρική με προσαρμογέα σειράς σωληναρίων.
4. Μεταφέρετε μέσω πιπέτας 10 μL δείγματος αναφοράς στις θέσεις 1 και 2 της σημασμένης σειράς σωληναρίων.
5. Μεταφέρετε μέσω πιπέτας τον υπολογισμένο όγκου νερού που απαιτείται για κάθε δείγμα στις αντίστοιχες θέσεις της σημασμένης σειράς σωληναρίων.
6. Μεταφέρετε μέσω πιπέτας τον υπολογισμένο όγκο RNA που απαιτείται για κάθε δείγμα στην κατάλληλη θέση στη σημασμένη σειρά σωληναρίων, χρησιμοποιώντας ένα νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε δείγμα.
7. Μόλις προστεθεί το δείγμα ασθενούς στη σειρά σωληναρίων, συνιστάται να τοποθετήσετε το σωληνάριο δείγματος στο στατώ σωληναρίων δείγματος, διατηρώντας τη σειρά με την οποία προστέθηκε το δείγμα στη σειρά σωληναρίων. Με αυτόν τον τρόπο μπορείτε να επαληθεύσετε ότι τα δείγματα προστέθηκαν με την προτιθέμενη σειρά, αφού προστεθούν όλα τα δείγματα στη σειρά σωληναρίων.
8. Μόλις προστεθούν όλα τα δείγματα στη σειρά σωληναρίων, επαληθεύστε ότι η σειρά δειγμάτων διατηρήθηκε στη σειρά σωληναρίων (μπορείτε να χρησιμοποιήσετε το φύλλο εργασίας σειράς αναλύσεων για την επαλήθευση της σειράς δειγμάτων).

α. Εάν χρειάζεται, επεξεργαστείτε το αναγνωριστικό σειράς αναλύσεων χρησιμοποιώντας το λογισμικό της Εφαρμογής Web, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύει τη σειρά δειγμάτων στην τελική διάταξη (για οδηγίες σχετικά με την επεξεργασία ενός υπάρχοντος αναγνωριστικού σειράς αναλύσεων, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος ανάλυσης nCounter).

9. Αφού επαληθεύσετε τη σειρά δειγμάτων, τοποθετήστε τα μεμονωμένα σωληνάκια δείγματος RNA πίσω στον πάγο.
10. Δημιουργήστε ένα κύριο μίγμα που να περιέχει 130 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Υβριδοποίησης και 65 μL CodeSet χρωστικής φθορισμού.

Σημείωση: Αν το CodeSet χρωστικής φθορισμού ήταν φυλαγμένο στον πάγο, αφήστε το να εξισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό προτού προσθέσετε το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδοποίησης.

11. Αναδεύετε με μεταφορά με πιπέτα και ελαττώστε την ταχύτητα του κύριου μίγματος για λίγο.

Σημείωση: Μην προσθέτετε το ProbeSet σύλληψης στο κύριο μίγμα ΚΑΙ μην φυλάσσετε το ολοκληρωμένο κύριο μίγμα στον πάγο.

12. Μεταφέρετε με πιπέτα 15 μL κύριου μίγματος σε κάθε ένα από τα 12 φρεάτια. Χρησιμοποιήστε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε φρεάτιο.

Σημείωση: Αφού ολοκληρώσετε το **next (επόμενο)** βήμα, πρέπει να τοποθετήσετε τη σειρά σωληναρίων στο συγκρότημα θέρμανσης στους 65°C μέσα σε 15 λεπτά.

13. Προσθέστε 5 μL ProbeSet σύλληψης σε κάθε φρεάτιο, χρησιμοποιώντας νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε φρεάτιο.

14. Πωμάτιστε τα φρεάτια της σειράς σωληναρίων και αναμίξτε τα αντιδραστήρια αναποδογυρίζοντας τη σειρά σωληναρίων πολλές φορές και τινάζοντας με το δάχτυλο για να διασφαλίσετε πλήρη ανάμιξη.

15. Ελαττώστε για λίγο την ταχύτητα περιδίνησης των δειγμάτων στη σειρά σωληναρίων σε μικροφυγοκεντρική ή μικροφυγοκεντρική (στα $< 3000 \times g$).

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε έναν μικροφυγοκεντρική που μπορεί να δεχθεί σειρά σωληναρίων 12 φρεατίων ή, εάν είναι απαραίτητο, έναν μικροφυγοκεντρική που μπορεί να δεχθεί κομμένες σειρές σωληναρίων.

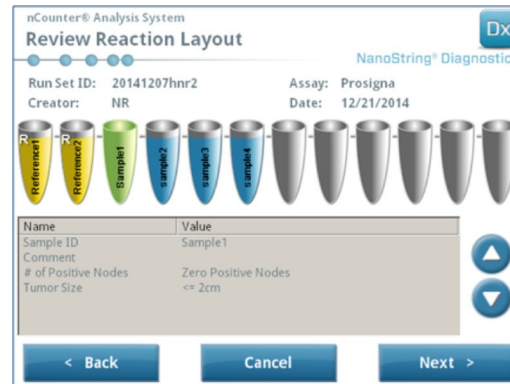
16. Τοποθετήστε τη σειρά σωληναρίων σε συγκρότημα θέρμανσης 65°C με θερμαινόμενο καπάκι. Επιάστε τους προσδιορισμούς υβριδοποίησης στους 65°C για 15–21 ώρες. Οι υβριδοποιήσεις πρέπει να παραμείνουν στους 65°C , μέχρι να είναι έτοιμοι για επεξεργασία στο Σταθμό Prep.

Σημείωση: Απορρίψτε τυχόν CodeSet που δεν έχετε χρησιμοποιήσει.

Επεξεργασία δειγμάτων στο Σταθμό Prep nCounter

1. Εντοπίστε το Σταθμό Prep που συσχετίζεται με τον Ψηφιακό αναλυτή.
2. Αφαιρέστε τις Φύσιγγες nCounter από τη φύλαξη στους -20°C και αφήστε τις να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10–15 λεπτά στο σάκο φύλλου αλουμινίου.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται εξαρτήματα από την ίδια παρτίδα kit.
3. Όταν η Φύσιγγα προσεγγίσει θερμοκρασία δωματίου, αφαιρέστε την από το σάκο φύλλου αλουμινίου πριν τοποθετήσετε τη Φύσιγγα στην πλατφόρμα του Σταθμού Prep.
4. Αφαιρέστε το Πλακίδιο(-α) Prep nCounter από τη φύλαξη στους 4°C και αφήστε το/τα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10–15 λεπτά.
Σημείωση: Για τις αναλύσεις που εκτελούνται με kit Prosigna 1, 2, 3 ή 4 δοκιμασιών, απαιτείται μόνο ένα Πλακίδιο Prep.
5. Φυγοκεντρίστε τα Πλακίδια Prep στα $2000 \times g$ για 2 λεπτά, έτσι ώστε να συλλεχθούν υγρά στον πυθμένα των φρεατίων πριν φορτώσετε τα Πλακίδια Prep στην πλατφόρμα του Σταθμού Prep.
6. Ενώ οι Φύσιγγες και το Πλακίδιο(-α) Prep προσεγγίζουν τη θερμοκρασία δωματίου, προετοιμάστε το Σταθμό Prep με τα αναλύσιμα του Πακέτου Prep nCounter.
7. Χρησιμοποιώντας τα περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής του Σταθμού Prep nCounter, επιλέξτε το κουμπί «Diagnostics» (Διαγνωστική) για τον προσδιορισμό σας.
8. Στην οθόνη του κύριου μενού, επιλέξτε το κουμπί «Process Samples» (Επεξεργασία δειγμάτων) στο περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής.
9. Μετακινηθείτε στη λίστα των διαθέσιμων αναγνωριστικών σειράς αναλύσεων (RSID) που εμφανίζεται στην οθόνη, για να επιβεβαιώσετε το RSID για τα δείγματα που υποβάλλονται εκείνη τη στιγμή σε επεξεργασία.
10. Επιλέξτε το RSID αγγίζοντας την οθόνη και επιλέξτε «Next» (Επόμενο) στο περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής.
11. Στο περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής, επαληθεύστε ότι έχει επιλεγεί το κατάλληλο RSID διαστυρώνοντας κάθε σωληνάριο στην οθόνη με τις πληροφορίες δειγμάτων.
 - α. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε το φύλλο εργασίας της σειράς αναλύσεων για την ιχνηλασιμότητα και την επαλήθευση των δειγμάτων.
 - β. Αν έχει επιλεγεί εσφαλμένο RSID, ακουμπήστε το κουμπί «Back» (Προηγούμενο) και επιλέξτε το σωστό RSID.
 - γ. Αν το RSID ήταν σωστό αλλά υπάρχουν σφάλματα καταχώρισης δειγμάτων, ακουμπήστε το κουμπί «Back» (Προηγούμενο) και μεταβείτε σε έναν σταθμό εργασίας υπολογιστή για να επεξεργαστείτε το RSID μέσω της εφαρμογής web.

Εικόνα 7: Επεξεργασία οθόνης ανάλυσης στο Σταθμό Prep



12. Στις οθόνες που ακολουθούν, θα σας ζητηθεί να σαρώσετε τα επιθυμητά αναγνωριστικά γραμμωτού κωδικού των αντιδραστηρίων στα ανοικτά πεδία ή να επιβεβαιώσετε την τοποθέτηση των απαιτούμενων αναλύσιμων στην πλατφόρμα. Αφού διεξάγετε κάθε εργασία, επιλέξτε «Next» (Επόμενο) στο περιβάλλον εργασίας οθόνης αφής για να μετακινηθείτε στην επόμενη προτροπή.

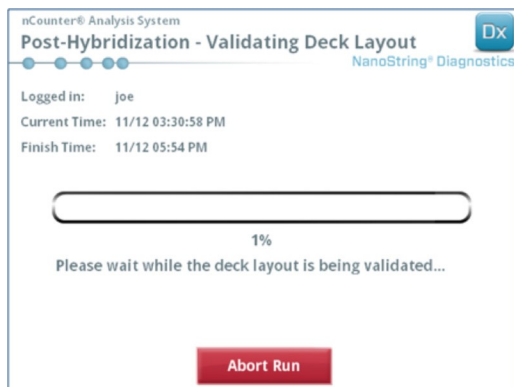
Σημείωση: Για τις αναλύσεις που εκτελούνται με kit Prosigna 1, 2, 3 ή 4 δοκιμασιών, απαιτείται μόνο ένα Πλακίδιο Prep και μία κενή σειρά σωληναρίων στη μονάδα θέρμανσης. Για αναλύσεις με kit 1, 2, 3 ή 4 δοκιμασιών, τοποθετήστε το Πλακίδιο Prep και την κενή σειρά σωληναρίων στη μονάδα θέρμανσης στις αντίστοιχες μπροστινές θέσεις (πλησιέστερα στο χρήστη) στην πλατφόρμα του Σταθμού Prep.

13. Αφαιρέστε τα δείγματα από το συγκρότημα θέρμανσης.
Σημείωση: Εκκινήστε την ανάλυση στο Σταθμό Prep μέσα σε 15 λεπτά από τη στιγμή αφαίρεσης των δειγμάτων από το συγκρότημα θέρμανσης.
14. Τοποθετήστε τη σειρά σωληναρίων σε έναν μικροφυγοκεντρική ή μινι-φυγοκεντρική και ελαττώστε ταχύτητα περιδίνησης για λίγο (στα $< 3000 \times g$).
15. Αφαιρέστε προσεκτικά τα πώματα σωληναρίων από τη σειρά σωληναρίων.
16. Οι εγκοπές στη σειρά σωληναρίων και οι οδηγίες στο Σταθμό Prep πρέπει να διατηρούν τη σωστή σειρά και προσανατολισμό των δειγμάτων.
17. Τοποθετήστε τη σειρά σωληναρίων με τα φρεάτια με τη σειρά 1-12 από τα αριστερά προς τα δεξιά στην πλατφόρμα του Σταθμού Prep nCounter. Αν εκτελείτε ανάλυση με kit 1, 2, 3 ή 4 δοκιμασιών, αρκεί να τοποθετηθεί μόνο

το πρώτο μισό τμήμα της σειράς σωληναρίων (φρεάτια 1–6) στην αριστερή πλευρά της διάταξης συγκράτησης σωληναρίου δείγματος στην πλατφόρμα, κατά περίπτωση. Έχετε υπόψη ότι είναι σημαντικό να χρησιμοποιήσετε μόνο τα φρεάτια 1-6. Το δεύτερο μισό τμήμα της σειράς σωληναρίων (φρεάτια 7-12) δεν χωράει στο αριστερό μισό τμήμα της διάταξης συγκράτησης λόγω των εγκοπών στο σωληνάριο.

18. Επιβεβαιώστε ότι η σειρά σωληναρίων εδράζεται σταθερά στο Σταθμό Prep και κλείστε το μεταλλικό καπάκι.
19. Αν το καπάκι δεν κλείσει καλά, θα σας ζητηθεί να το κλείσετε κατά την επαλήθευση της διάταξης της πλατφόρμας.
20. Επιλέξτε «Next» (Επόμενο) στο περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής.
21. Κλείστε τη θύρα του οργάνου όταν σας ζητηθεί και επιλέξτε «Next» (Επόμενο) για να ξεκινήσετε την επαλήθευση διάταξης πλατφόρμας.
22. Αν παρουσιαστεί σφάλμα, ακολουθήστε τις οδηγίες που σχετίζονται με το συγκεκριμένο σφάλμα για να συνεχίσετε με την επαλήθευση διάταξης πλατφόρμας.

Εικόνα 8: Επαλήθευση διάταξης πλατφόρμας Σταθμού Prep μετά την υβριδοποίηση



23. Αφού επαληθευτεί η διάταξη της πλατφόρμας, επιλέξτε «Start Processing» (Εναρξη επεξεργασίας) στο περιβάλλον εργασίας της οθόνης αφής.
Σημείωση: Αν αντιμετωπίσετε προβλήματα κατά την εκκίνηση του Σταθμού Prep, επιστρέψτε τα υβριδοποιημένα δείγματα σας στο συγκρότημα θέρμανσης, αλλά μην υπερβείτε το μέγιστο χρόνο των 21 ωρών.
24. Μόλις ολοκληρωθεί η ανάλυση, ακολουθήστε τις προτροπές στο Σταθμό Prep.
25. Μόλις ο Σταθμός Prep ολοκληρώσει την ανάλυση, αφαιρέστε προσεκτικά τη φύσιν από το Σταθμό Prep και σφραγίστε τα φρεάτια της φύσιγγας με το παρεχόμενο αυτοκόλλητο κάλυμμα φρεατίων Φύσιγγας.
Σημείωση: Μην αφήνετε τη Φύσιν χωρίς σφράγιση στο Σταθμό Prep όλη τη νύχτα.
26. Αν δεν πρόκειται να σαρώσετε τα δείγματα την ίδια ημέρα, φυλάξτε τα στους 4°C σε ένα αδιαφανές κουτί για μέγιστο διάστημα 1 εβδομάδας.

Σάρωση Φύσιγγας στον Ψηφιακό αναλυτή nCounter

1. Εντοπίστε τον Ψηφιακό αναλυτή που συνδέεται με το Σταθμό Prep που πραγματοποίησε την επεξεργασία των δειγμάτων. Τοποθετήστε τη Φύσιν στον Ψηφιακό αναλυτή nCounter για σάρωση.
 - α. Ανοίξτε τη θύρα του Ψηφιακού αναλυτή.
 - β. Τοποθετήστε τη Φύσιν που θέλετε να προσθέσετε σε μια κενή υποδοχή.
 - γ. Κλείστε τη θύρα και ανατρέξτε στην οθόνη αφής.
2. Το περιβάλλον εργασίας οθόνης αφής του Ψηφιακού αναλυτή έχει διάφορα γραφικά που βοηθούν στον εύκολο καθορισμό της κατάστασης των θέσεων:
 - α. Κενή θέση: Αυτή η υποδοχή είναι κενή και έτοιμη για τοποθέτηση νέας Φύσιγγας.
 - β. Πλήρης μπλε Φύσιν: Ολοκληρωμένη σάρωση.**ΜΗΝ ΑΦΑΙΡΕΙΤΕ ΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΗΣ ΦΥΣΙΓΓΕΣ:**
 - α. Λευκή Φύσιν: Αυτή η υποδοχή περιέχει μια Φύσιν που έχει καταχωριστεί, αλλά δεν έχει σαρωθεί.
 - β. Μερικώς μπλε Φύσιν: Αυτή η υποδοχή περιέχει μια Φύσιν της οποίας η σάρωση βρίσκεται σε εξέλιξη.
3. Οι Φύσιγγες των οποίων η σάρωση έχει ολοκληρωθεί μπορούν να αφαιρεθούν από τον Ψηφιακό αναλυτή.
4. Αν πρόκειται για την πρώτη Φύσιν που έχει τοποθετηθεί στον Ψηφιακό αναλυτή, ακουμπήστε το κουμπί «Main Menu» (Κύριο μενού) για να συνδεθείτε στον Ψηφιακό αναλυτή. Αν ο Ψηφιακός αναλυτής σαρώνει ήδη Φύσιγγες, συνεχίστε στο βήμα 9 παρακάτω.
5. Τοποθετήστε προσεκτικά τη Φύσιν σε μια κενή υποδοχή (δείτε τον οδηγό κατάστασης θέσεων παραπάνω) στον Ψηφιακό αναλυτή. Η υποδοχή και η Φύσιν φέρουν σήμανση, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο σωστός προσανατολισμός. Ο γραμμωτός κωδικός θα είναι στραμμένος προς τα πάνω.
6. Χαμηλώστε το κάλυμμα της υποδοχής και πιέστε τη Φύσιν από το άνοιγμα στο καπάκι της υποδοχής, ώστε να διασφαλιστεί ότι η Φύσιν εδράζεται σωστά.

7. Ακουμπήστε το κουμπί «Start Counting» (Εναρξη μέτρησης) και περιμένετε το σαρωτή να εκκινήσει τη διαδικασία σάρωσης. Όταν ο Ψηφιακός αναλυτής εκκινήσει τη σάρωση της Φύσιγγας, θα ακούσετε μια σειρά σύντομων ρυθμικών ήχων κλικ.
8. Επιβεβαιώστε ότι εμφανίζεται μια μπλε γραμμή στη θέση Φύσιγγας στην οθόνη (μέσα σε πέντε λεπτά από την εκκίνηση της σάρωσης), η οποία δηλώνει ότι η σάρωση έχει ξεκινήσει.
9. Για να προσθέσετε μια Φύσιν σε Ψηφιακό αναλυτή που σαρώνει ήδη Φύσιγγες, ακουμπήστε το «Pause» (Παύση) στην οθόνη «Counting Cartridges» (Μέτρηση φυσιγγών) και περιμένετε μέχρι ο Ψηφιακός αναλυτής να διακόψει την τρέχουσα σάρωση.
10. Ανοίξτε τη θύρα του Ψηφιακού αναλυτή.
11. Τοποθετήστε τη Φύσιν που θέλετε να προσθέσετε σε μια κενή υποδοχή (δείτε τον οδηγό κατάστασης θέσεων παραπάνω).
12. Κλείστε τη θύρα και ακουμπήστε το «Resume» (Συνέχεια).
13. Όταν ολοκληρωθεί η σάρωση, το λογισμικό θα αποστείλει την αναφορά στις διευθύνσεις email των χρηστών που έχουν καθοριστεί προηγουμένως.
14. Μόλις λάβετε την ειδοποίηση μέσω email, αφαιρέστε τη σαρωμένη Φύσιν και απορρίψτε την σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ιδρύματός σας.
Σημείωση: Δημιουργούνται αναφορές για τις αναλύσεις που έχουν ολοκληρωθεί με επιτυχία, καθώς και για τις αναλύσεις με σφάλματα σχετικά με τον Ποιοτικό έλεγχο (QC) των δεδομένων. Δεν δημιουργούνται αναφορές σε περίπτωση σφάλματος που δεν σχετίζεται με τον QC των δεδομένων. Σε αυτήν την περίπτωση, επικοινωνήστε με το Τμήμα Εξυπηρέτησης Πελατών της Veracyte για βοήθεια.
15. Μέσω του συνδέσμου που επισυνάπτεται στο email, ανοίξτε την εφαρμογή web και προβείτε στη λήψη όλων των αναφορών της δοκιμασίας που σχετίζονται με το RSID που υποβάλλεται εκείνη τη στιγμή σε επεξεργασία.
16. Έπειτα από σφάλματα: Ακολουθήστε τις συστάσεις που αναφέρονται στην αναφορά δοκιμασίας για σφάλματα μεμονωμένων δειγμάτων ή συστήματος.
Σημείωση: Οι αποτυχίες μεμονωμένων δειγμάτων δεν θεωρούνται σφάλματα Συστήματος.

12 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Πίνακας 7: Κωδικό σφάλματος για Επανάληψη της Δοκιμασίας

Κωδικός σφάλματος	Περιγραφή αποτυχίας	Συνιστώμενη ενέργεια
5	Αποτυχία σάρωσης	Επαναλάβετε την ανάλυση του δείγματος με 250 ng RNA
7	Υψηλό σήμα	Καθορίστε ξανά τις προδιαγραφές του δείγματος και επαναλάβετε την ανάλυση της δοκιμασίας με 125 ng RNA
6	Χαμηλό σήμα	Καθορίστε ξανά τις προδιαγραφές του δείγματος και επαναλάβετε την ανάλυση της δοκιμασίας με 500 ng RNA
30	Χαμηλό σήμα	Καθορίστε ξανά τις προδιαγραφές του δείγματος και επαναλάβετε την ανάλυση της δοκιμασίας με 500 ng RNA
31	Χαμηλό σήμα RNA	Καθορίστε ξανά τις προδιαγραφές του δείγματος και επαναλάβετε την ανάλυση της δοκιμασίας με 500 ng RNA

Αιτίες επανάληψης του προσδιορισμού:

1. Η αναφορά του προσδιορισμού αναγνωρίζει τα δείγματα αποτυχίας και δεν αναφέρονται αποτελέσματα από τον προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αναφέρονται εάν τα δείγματα έχουν αναλυθεί με επιτυχία.
2. Η αναφορά του προσδιορισμού προσδιορίζει τον τύπο της αποτυχίας και τη συνιστώμενη ενέργεια σε περίπτωση αποτυχίας του προσδιορισμού. Η συγκέντρωση RNA των αποτυχημένων δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί ξανά και τα δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε νέα ανάλυση (ως τμήμα νέας παρτίδας/RSID) ανάλογα με τον τύπο της αποτυχίας και την ποσότητα της μάζας RNA που απομένει για τη λήψη αποτελέσματος από τον προσδιορισμό.

13 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο Προσδιορισμός Prosigna περιλαμβάνει μια σειρά μετρικών μεγεθών ποιοτικού ελέγχου που εφαρμόζονται αυτόματα σε κάθε δείγμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Αυτά τα μετρικά μεγέθη εκτιμούν την απόδοση του προσδιορισμού, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν τα αποτελέσματα εμπνέουν στις αναμενόμενες τιμές. Μετά την επιτυχημένη ανάλυση αυτών των μετρικών μεγεθών ποιοτικού ελέγχου, ο Προσδιορισμός Prosigna δίνει τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 8: Αποτελέσματα και τιμές εξόδου Προσδιορισμού Prosigna

Αποτέλεσμα	Τιμές εξόδου
Ο ενδογενής υπότυπος του δείγματος καρκίνου του μαστού	Αυλικού τύπου A Αυλικού τύπου B HER2-εμπλοπισμένος Βασικού τύπου
Μεμονωμένη εκτίμηση της πιθανότητας απομακρυσμένης υποτροπής μέσα σε 10 έτη	0-100%
Βαθμολογία Κινδύνου υποτροπής (ROR)	Ακέραια τιμή στην κλίμακα 0-100
Κατηγορία κινδύνου	Χαμηλός, μεσαίος, υψηλός

13.1 Ενδογενείς υπότυποι

Ο ενδογενής υπότυπος ενός καρκίνου του μαστού έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου. Κατά μέσο όρο, οι ασθενείς με όγκο αυλικού τύπου A έχουν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα από τις ασθενείς με όγκους αυλικού τύπου B, HER2-εμπλουτισμένους ή βασικού τύπου.

Ο ενδογενής υπότυπος προσδιορίζεται με τη σύγκριση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης 50 γονιδίων σε ένα άγνωστο δείγμα με τα αναμενόμενα προφίλ έκφρασης για τους τέσσερις ενδογενείς υποτύπους. Ο υπότυπος με το πιο όμοιο προφίλ εκχωρείται στο άγνωστο δείγμα.

Οι πιο κοινοί υπότυποι καρκίνου του μαστού είναι οι αυλικόι υπότυποι, ο Αυλικός τύπος A (LumA) και ο Αυλικός τύπος B (LumB). Προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο αυλικός τύπος A συνιστά κατά προσέγγιση το 30% έως 40% και ο αυλικός τύπος B κατά προσέγγιση το 20% των καρκίνων του μαστού⁵. Ωστόσο, ποσοστό άνω του 90% των ασθενών με θετικό ορμονικό υποδοχέα έχουν όγκους αυλικού τύπου. Το σχήμα γονιδιακής έκφρασης αυτών των υποτύπων μοιάζει με το αυλικό επιθηλιακό στοιχείο του ιστού του μαστού⁵. Αυτοί οι όγκοι χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση υποδοχέα οιστρογόνων (ER), υποδοχέα προλακτοτρίνης (PR) και γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση ER, όπως το LIV1, το GATA3 και η κυκλίνη D1, καθώς και από την έκφραση των αυλικών κυτταροκερατινών 8 και 18. Οι καρκίνοι του μαστού αυλικού τύπου A παρουσιάζουν χαμηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου σε σύγκριση με τους καρκίνους του μαστού αυλικού τύπου B, με αποτέλεσμα καλύτερη πρόγνωση.

Προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο υπότυπος HER2-εμπλουτισμένος (HER2-E) συνιστά κατά προσέγγιση το 20% των καρκίνων του μαστού⁵. Ωστόσο, οι HER2-εμπλουτισμένοι όγκοι είναι συνήθως ER-αρνητικοί, γι' αυτό μόνο το 5% του ελεγχμένου πληθυσμού ασθενών με ER-θετικό απαιτείται με HER2-εμπλουτισμένο καρκίνο του μαστού. Ανεξάρτητα από την κατάσταση ER, οι HER2-εμπλουτισμένοι όγκοι είναι HER2-θετικοί στην πλειοψηφία των περιπτώσεων με υψηλή έκφραση συρροής κρουσμάτων ERBB2, συμπεριλαμβανομένων των ERBB2 και GRB7. Τα γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου έχουν επίσης υψηλή έκφραση.

Δημοσιευμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο υπότυπος βασικού τύπου συνιστά κατά προσέγγιση το 20% των καρκίνων του μαστού⁵. Ωστόσο, οι όγκοι βασικού τύπου είναι γενικά ER-αρνητικοί, γι' αυτό μόνο 1% των ασθενών με θετικό ορμονικό υποδοχέα έχουν καρκίνο του μαστού βασικού τύπου. Ο βασικός τύπος είναι σχεδόν πάντα HER2-αρνητικός και εκφράζει μια σειρά βασικών βιολογικών δεικτών, συμπεριλαμβανομένων των βασικών επιθηλιακών κυτταροκερατινών (CK) και του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Τα γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου έχουν υψηλή έκφραση.

13.2 Βαθμολογία ROR

Η βαθμολογία ROR είναι μια ακέραια τιμή στην κλίμακα 0–100 που σχετίζεται με την πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής μίας μεμονωμένης ασθενούς μέσα σε 10 έτη για τον πληθυσμό της καθορισμένης προτιθέμενης χρήσης. Η βαθμολογία ROR υπολογίζεται με τη σύγκριση του προφίλ έκφρασης 46 γονιδίων σε ένα άγνωστο δείγμα με τα αναμενόμενα προφίλ για τους τέσσερις ενδογενείς υποτύπους, όπως περιγράφεται παραπάνω, έτσι ώστε να υπολογιστούν τέσσερις διαφορετικές τιμές συσχέτισης. Στη συνέχεια, αυτές οι τιμές συσχέτισης συνδυάζονται με μια βαθμολογία πολλαπλασιασμού και το χονδρικό μέγεθος του όγκου, ώστε να υπολογιστεί η βαθμολογία ROR.

13.3 Πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη

Οι βαθμολογίες ROR για 2 ομάδες πληθυσμού μετεμμηνοπαυσικών γυναικών με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα πρώιμου σταδίου συγκρίθηκαν με την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής έπειτα από χειρουργείο και αγωγή επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας διάρκειας 5 ετών, καθώς και από μετέπειτα παρατήρηση 5 ετών (για λεπτομέρειες, βλ. Ενότητα 16.4 Κλινική απόδοση). Αυτές οι δύο μελέτες οδήγησαν σε ένα μοντέλο που συσχετίζει τη βαθμολογία ROR με την πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής σε αυτόν τον ελεγχμένο πληθυσμό ασθενών, συμπεριλαμβανομένου ενός διαστήματος εμπιστοσύνης 95%.

13.4 Ταξινόμηση κινδύνου

Παρέχεται επίσης ταξινόμηση κινδύνου, έτσι ώστε η βαθμολογία ROR να μπορεί να ερμηνευτεί με τη χρήση τιμών αποκόπης που σχετίζονται με το κλινικό αποτέλεσμα σε ελεγχμένους πληθυσμούς ασθενών.

Πίνακας 9: Ταξινόμηση κινδύνου με βάση το εύρος ROR και την κατάσταση λεμφαδένων

Κατάσταση λεμφαδένων	Εύρος ROR	Ταξινόμηση κινδύνου
Αρνητικοί λεμφαδένες	0-40	Χαμηλός
	41-60	Μεσαίος
	61-100	Υψηλός
Θετικοί λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες)	0-15	Χαμηλός
	16-40	Μεσαίος
	41-100	Υψηλός
Θετικοί λεμφαδένες (≥ 4 λεμφαδένες)	0-100	Υψηλός

13.5 Ποιοτικός έλεγχος

Κάθε παρτίδα των στοιχείων του προσδιορισμού Prosigna ελέγχεται με τη χρήση προκαθορισμένων προδιαγραφών. Όλα τα στοιχεία σε επίπεδο kit έχουν ιχνηλάτηση παρτίδας και τα σημαντικά στοιχεία που περιέχονται σε κάθε kit ελέγχονται μαζί και κυκλοφορούν ως Παρτίδα kit Prosigna.

Το kit του Προσδιορισμού Prosigna περιλαμβάνει μια σειρά εσωτερικών υλικών ελέγχου που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας κάθε σειράς αναλύσεων συνολικά και για κάθε μεμονωμένο δείγμα. Αυτά τα υλικά ελέγχου παρατίθενται παρακάτω.

Σειρά υλικών ελέγχου παρτίδας: Δείγμα Αναφοράς με *In vitro* μεταγραφμένο RNA

Ένα συνθετικό Δείγμα Αναφοράς RNA περιλαμβάνεται ως υλικό ελέγχου στο kit του Προσδιορισμού Prosigna. Το Δείγμα Αναφοράς αποτελείται από *in-vitro* μεταγραφμένους στόχους RNA από τον αλγόριθμο 50 και 8 γονίδια κυτταρικής οικονομίας. Το Δείγμα Αναφοράς υποβάλλεται δύο φορές σε επεξεργασία σε κάθε ανάλυση προσδιορισμού Prosigna σε συνδυασμό με μια σειρά 10 δειγμάτων RNA άγνωστου όγκου του μαστού σε μια σειρά σωληναρίων 12 αντιδράσεων. Το σήμα από το Δείγμα Αναφοράς αναλύεται ως προς προκαθορισμένα κατώφλια για να επιτευχθούν οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την ανάλυση.

Το σήμα από κάθε γονίδιο από τα 50 γονίδια του αλγόριθμου του δείγματος RNA καρκίνου του μαστού κανονικοποιείται ως προς τα αντίστοιχα γονίδια του δείγματος αναφοράς.

Σειρά θετικών υλικών ελέγχου: *in vitro* μεταγραφμένοι στόχοι RNA και αντίστοιχοι ανιχνευτές σύλληψης και αναφοράς

Χρησιμοποιούνται συνθετικοί στόχοι RNA ως θετικά υλικά ελέγχου (PC) για τον Προσδιορισμό Prosigna. Οι αλληλουχίες των στόχων PC προέρχονται από τη βιβλιοθήκη ακολουθιών DNA της Κοινοπραξίας εξωτερικών υλικών ελέγχου RNA (ERCC)⁶. Οι στόχοι RNA μεταγράφονται *in-vitro* από πλασμίδια DNA. Στο kit του προσδιορισμού, συμπεριλαμβάνονται έξι στόχοι RNA σε σειρά τιτλοποίησης 4 ανεξίτηλων (τελική συγκέντρωση 128–0,125 fM στην αντίδραση υβριδοποίησης) σε συνδυασμό με τους αντίστοιχους ανιχνευτές σύλληψης και αναφοράς. Τα PC προστίθενται σε κάθε δείγμα RNA καρκίνου του μαστού και σε κάθε Δείγμα Αναφοράς που ελέγχεται με τον Προσδιορισμό Prosigna. Ένα δείγμα εξαιρείται από την περαιτέρω ανάλυση, εάν η ένταση σήματος από τα PC δεν πληροί τα προκαθορισμένα κατώφλια.

Σειρά αρνητικών υλικών ελέγχου: εξωγενείς ανιχνευτές χωρίς στόχους

Οι αλληλουχίες των στόχων αρνητικών στοιχείων ελέγχου προέρχονται από τη βιβλιοθήκη ακολουθιών DNA ERCC⁶. Οι ανιχνευτές που έχουν σχεδιαστεί ώστε να εντοπίζουν αυτές τις ακολουθίες στόχων περιλαμβάνονται στο kit προσδιορισμού χωρίς την αντίστοιχη ακολουθία στόχου. Τα αρνητικά υλικά ελέγχου (NC) προστίθενται σε κάθε δείγμα RNA καρκίνου του μαστού και σε κάθε Δείγμα Αναφοράς που ελέγχεται με τον Προσδιορισμό Prosigna ως μέτρο ποιοτικού ελέγχου. Το δείγμα εξαιρείται από την περαιτέρω ανάλυση, εάν η ένταση σήματος από τα NC δεν πληροί τα προκαθορισμένα κατώφλια.

Σειρά υλικών ελέγχου ακεραιότητας RNA: Γονίδια κυτταρικής οικονομίας

Στο kit Prosigna περιλαμβάνονται Ανιχνευτές σύλληψης και αναφοράς που έχουν σχεδιαστεί ώστε να ανιχνεύουν 8 γονίδια κυτταρικής οικονομίας και 50 γονίδια αλγόριθμου. Αναλύονται τα επίπεδα έκφρασης των 8 γονιδίων κυτταρικής οικονομίας, έτσι ώστε να καθοριστεί η ποιότητα του εξαγμένου RNA από το δείγμα ιστού FFPE και εισάγονται στον Προσδιορισμό Prosigna. Το δείγμα εξαιρείται από την περαιτέρω ανάλυση, εάν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας είναι κάτω από τα προκαθορισμένα κατώφλια.

Τα γονίδια κυτταρικής οικονομίας χρησιμοποιούνται επίσης για την κανονικοποίηση τυχόν διαφορών στην ποσότητα άθικτου RNA σε ένα δείγμα πριν από την κανονικοποίηση του Δείγματος Αναφοράς.

14 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

- Ο Προσδιορισμός Prosigna έχει βελτιστοποιηθεί έτσι ώστε να προσδιορίζει τον ενδογενή υπότυπο ενός όγκου καρκίνου του μαστού και τον κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη για μία ασθενή ως Βαθμολογία ROR και κατηγορία κινδύνου, με τη χρήση καθαρισμένου RNA που έχει εξαχθεί από ανθρώπινο ιστό μαστού μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη. Άλλοι τύποι δειγμάτων ή μονιμοποιητικών δεν έχουν ελεγχθεί και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.
- Η απόδοση του Προσδιορισμού Prosigna έχει επικυρωθεί με τη χρήση των διαδικασιών που παρέχονται σε αυτό και μόνο ένθετο συσκευασίας. Τυχόν τροποποιήσεις σε αυτές τις διαδικασίες μπορεί να τροποποιήσουν την απόδοση της δοκιμασίας.
- Έχουν καθιερωθεί χαρακτηριστικά απόδοσης του Προσδιορισμού Prosigna για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα πρώιμου σταδίου που έλαβαν επικουρική ενδοκρινική θεραπεία για 5 έτη. Δεν έχει καθιερωθεί απόδοση με άλλες θεραπευτικές αγωγές ή σε άλλους πληθυσμούς ασθενών.
- Αν προστεθεί RNA ανεπαρκούς ποιότητας ή ποσότητας στον προσδιορισμό, τότε ο Προσδιορισμός Prosigna μπορεί να μην είναι σε θέση να δώσει έγκυρο αποτέλεσμα και θα αναφέρει αποτυχία του προσδιορισμού.
- Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων του Προσδιορισμού Prosigna (ενδογενής υπότυπος, βαθμολογία ROR, κατηγορία κινδύνου) πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο άλλων κλινικών/παθολογοανατομικών παραγόντων, του ιατρικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων αποτελεσμάτων εργαστηριακών εξετάσεων.

- Η απόδοση του Προσδιορισμού Prosigna έχει καθιερωθεί με RNA που πληροί τις προδιαγραφές που έχουν οριστεί σχετικά με την παραπάνω διαδικασία. Η απόδοση με απομονωμένο RNA που δεν πληροί αυτές τις προδιαγραφές δεν έχει καθιερωθεί.
- Οι γνωστές παρεμβάλλουσες ουσίες στον Προσδιορισμό Prosigna περιλαμβάνουν το γενωμικό DNA και μη καρκινικούς ιστούς (π.χ. φυσιολογικός ιστός). Ανατρέξτε στα «Γενικά ζητήματα σχετικά με τον προσδιορισμό» προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία. Πριν από την εκτέλεση της διαδικασίας, πρέπει να καθοριστεί με σαφήνεια η περιοχή ζωτικού διηθητικού καρκινώματος από έναν παθολογοανατόμο. Επιπλέον, κάθε δείγμα RNA πρέπει να υποβληθεί σε επεξεργασία με Δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Προτού συνεχίσετε με δείγματα ασθενών, κάθε νέα παρτίδα Δεοξυριβονουκλεάσης πρέπει να ελεγχθεί και να επαληθευτεί σύμφωνα με τις παρεχόμενες προδιαγραφές, όταν χρησιμοποιείται kit απομόνωσης διαφορετικό από το kit απομόνωσης RNA από FFPET της Roche.

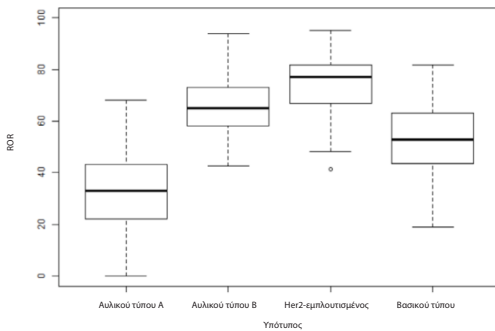
15 ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Ο Προσδιορισμός Prosigna αναφέρει μια βαθμολογία ROR (0-100), έναν ενδογενή υπότυπο (Αυλικού τύπου A, Αυλικού τύπου B, HER2-εμπλουτισμένο ή βασικού τύπου) και μια κατηγορία κινδύνου (χαμηλή, μεσαία ή υψηλή) για κάθε δείγμα ούγκου. Με βάση δύο κλινικές μελέτες επικύρωσης που περιγράφονται παρακάτω, μετεμνηνοπαισιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού HR+, πρώιμου σταδίου που έλαβαν αναστροζόλη ή ταμοξифαίνη στις δοκιμές ATAC και ABCSG-8, παρουσιάζεται το εύρος και η συχνότητα των βαθμολογιών ROR (Εικόνα 10), η συνεχής σχέση της βαθμολογίας ROR με την πιθανότητα απομακρυσμένης υποτροπής κατά κατάσταση λεμφαδένων (Εικόνα 11) και η κατανομή των βαθμολογιών ROR κατά ενδογενή υπότυπο (Εικόνα 9) που αναμένονται. Με βάση αυτές τις κλινικές μελέτες επικύρωσης, η επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη κατά κατηγορία κινδύνου αναπαρίσταται στην Εικόνα 12 (ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες) και στην Εικόνα 13 (ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες)).

15.1 Εύρος βαθμολογίας ROR κατά υπότυπο

Η Εικόνα 9 δείχνει ένα διάγραμμα πλαισίων βαθμολογίας ROR κατά τον ενδογενή υπότυπο.

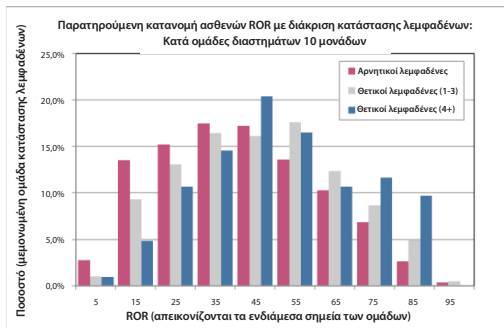
Εικόνα 9: Διάγραμμα πλαισίων βαθμολογίας ROR κατά ενδογενή υπότυπο



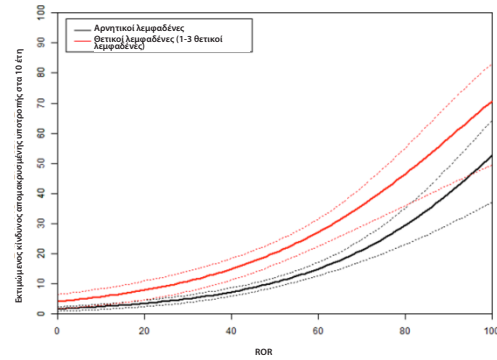
15.2 Συχνότητα βαθμολογίας ROR κατά κατάσταση λεμφαδένων

Το ιστόγραμμα στην Εικόνα 10 δημιουργήθηκε με ένα μοντέλο Cox, που περιλάμβανε βαθμολογία ROR και κατηγοριακές μεταβλητές για τη διάκριση των τριών ομάδων κατάστασης λεμφαδένων.

Εικόνα 10: Ιστόγραμμα βαθμολογίας ROR και ομάδων κατάστασης λεμφαδένων



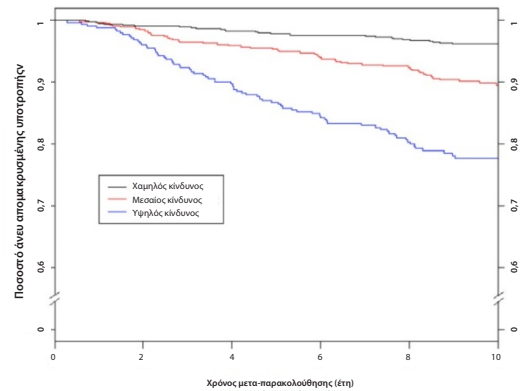
Εικόνα 11: Προβλεπόμενος κίνδυνος στα δέκα έτη εκτιμώμενος εντός της ομάδας κατάστασης λεμφαδένων



15.3 Επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής κατά κατηγορία κινδύνου

Τα παρακάτω δεδομένα προέρχονται από τη συνδυαστική ανάλυση των δοκιμών TransATAC και ABCSG-8. Για την εκχώρηση ασθενών σε ομάδες κινδύνου, συγκρίθηκαν οι βαθμολογίες ROR με προκαθορισμένα κατώφλια κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς ή θετικούς λεμφαδένες. Οι Εικόνες 12 και 13 δείχνουν την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη για κάθε ομάδα κατηγορίας κινδύνου κατά κατάσταση λεμφαδένων.

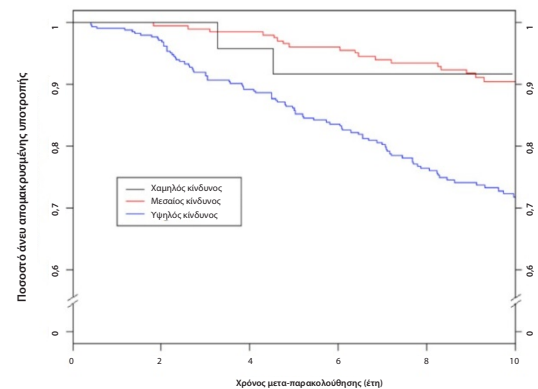
Εικόνα 12: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 12: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Μεσαίος	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Υψηλός	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Συνολικά	1.786 (100%)	157	

Εικόνα 13: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 13: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Μεσαίος	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Υψηλός	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Συνολικά	590 (100%)	107	

Πίνακας 10: Ποσοστά DRFS στα 10 έτη για ασθενείς με 4 και άνω θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Υψηλός	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

16 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

16.1 Αναλυτική ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα

Για να εκτιμηθεί η συνολική ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα του Prosigna, διεξήχθησαν δύο μελέτες από τις οποίες συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα. Η πρώτη μελέτη ήταν μια μελέτη ακρίβειας στο Σύστημα ανάλυσης nCounter με εξαγμένο RNA από καρκίνο του μαστού και η δεύτερη μελέτη ήταν μια μελέτη αναπαραγωγιμότητας με ιστό καρκίνου του μαστού FFPE που περιλάμβανε προ-αναλυτικούς παράγοντες.

Ακρίβεια RNA

16.1.1 Σχεδίαση μελέτης

Μια τυφλή και τυχαιοποιημένη συγκριτική μελέτη τριών τοποθεσιών διεξήχθη με τον Προσδιορισμό Prosigna στο Σύστημα ανάλυσης nCounter για την αξιολόγηση της αναλυτικής ακρίβειας. Πέντε σταθμισμένα δείγματα RNA όγκου του μαστού RNA παράχθηκαν από αρχειοθετημένα δείγματα FFPE για έλεγχο σε κάθε τοποθεσία. Το πάνελ δειγμάτων αντιπροσώπευε πρωτότυπα προφίλ γονιδιακής έκφρασης που απαντήθηκαν κατά τον έλεγχο ρουτίνας και κάθε ομάδα κατηγορίας κινδύνου.

Κάθε τοποθεσία ολοκλήρωσε 18 έγκυρες αναλύσεις (9 αναλύσεις ανά χειριστή, κάθε ανάλυση περιλάμβανε 10 δοκιμασίες) και μετά μια ανάλυση εξοικείωσης από κάθε χειριστή (Πίνακας 11). Κάθε δείγμα ελέγχθηκε εις διπλούν κατά τη διάρκεια κάθε ανάλυσης στο ονομαστικό επίπεδο εισόδου RNA 250 ng για τον προσδιορισμό. Κάθε χειριστής ολοκλήρωσε μία ανάλυση σε μια δεδομένη ημέρα σύμφωνα με το γενικά αποδεκτό πρότυπο για μεθόδους ανάλυσης μακράς διάρκειας. Η συνολική περίοδος της μελέτης μαζί με την εξοικείωση διήρκεσε περισσότερο από 4 εβδομάδες σε κάθε τοποθεσία.

Πίνακας 11: Επισκόπηση μελέτης ακρίβειας RNA

Μεταβλητή μελέτης	Αριθμοί
Αριθμός δειγμάτων RNA όγκου του μαστού	5
Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά ανάλυση (ίδια φύσιγγα)	2
Αριθμός αναλύσεων/τοποθεσία	18
Αριθμός αναλύσεων/ημέρα	1
Αριθμός χειριστών/τοποθεσία	2
Αριθμός παρτίδων αντιδραστηρίων/τοποθεσία	3
Αριθμός τοποθεσιών	3
Συνολικός αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν ανά τοποθεσία (εκτός από την εξοικείωση) =	180
Συνολικός αριθμός δειγμάτων =	540

16.1.2 Ανάλυση συνιστωσών απόκλισης

Ο Πίνακας 12 δείχνει το αποτέλεσμα από την ανάλυση συνιστωσών απόκλισης για κάθε μέλος του πάνελ. Κάτω από την εκτιμώμενη απόκλιση είναι το ποσοστό της συνολικής απόκλισης (εντός παρενθέσεων).

Πίνακας 12: Συνιστώσες απόκλισης κατά μέλος πάνελ (σταθμισμένο δείγμα RNA)

Μέλος πάνελ κατά κίνδυνο, υπότυπο	Μέσο ROR	Συνιστώσα απόκλισης					Συνολική απόκλιση	Συνολική SD
		Παρτίδα	Τοποθεσία	Χειριστής	Ανάλυση	Εντός της ανάλυσης		
Χαμηλός Αυλικού τύπου A	31,4	0,010 (2%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (30%)	0,296 (67%)	0,44 (100%)	0,66
Μεσαίος Αυλικού τύπου B	55	0,105 (18%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (8%)	0,426 (74%)	0,576 (100%)	0,76
Μεσαίος Βασικού τύπου	55,4	0,059 (20%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (15%)	0,194 (65%)	0,299 (100%)	0,55
Υψηλός Αυλικού τύπου B	64,8	0,119 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,380 (66%)	0,576 (100%)	0,76
Υψηλός HER2-εμπλουτισμένος	76,2	0,165 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (63%)	0,442 (100%)	0,66

Και για τα πέντε μέλη του πάνελ, η συνολική τυπική απόκλιση (SD) ήταν μικρότερη από 1 μονάδα ROR σε κλίμακα 0-100. Για όλα τα μέλη του πάνελ, ο μεγάλος όγκος της απόκλισης προήρθε από την απόκλιση εντός της ανάλυσης (επαναληψιμότητα). Η απόκλιση μεταξύ τοποθεσιών ή μεταξύ χειριστών ήταν μηδαμινή. Ένας έλεγχος αναλογίας πιθανοτήτων για τη σημαντικότητα της τοποθεσίας κατά μέλος πάνελ έδειξε ότι οι διαφορές τοποθεσίας ήταν στατιστικά ασήμαντες ($p > 0,05$). Για κάθε παρτίδα, οι διαφορές στις μέσες βαθμολογίες ROR είναι μικρότερες από 1 μονάδα ROR για κάθε μέλος του πάνελ, συμβάλλοντας σε περίπου 20% κατά μέσο όρο στη συνολική απόκλιση.

16.1.3 Συμφωνία υποτύπου και κατηγορίας κινδύνου

Για όλα τα μέλη του πάνελ, υπήρχε συμφωνία 100% μεταξύ του αποτελέσματος του υποτύπου και του ενδογενούς υποτύπου του μέλους του πάνελ. Για όλα τα δείγματα, υπήρχε συμφωνία 100% μεταξύ της μετρηθείσας και αναμενόμενης ομάδας κινδύνου.

Αναπαραγωγιμότητα ιστού

16.1.4 Σχεδίαση μελέτης

Διεξήχθη μια τυφλή, τυχαιοποιημένη συγκριτική μελέτη τριών τοποθεσιών, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν πανομοιότυπα δείγματα ιστού καρκίνου του μαστού από το ίδιο μπλοκ FFPE, στο Σύστημα ανάλυσης nCounter με τη χρήση του Προσδιορισμού Prosigna. Στη μελέτη ελέγχθηκε μια σειρά 43 πρόσφατα αποθηκευμένων δειγμάτων καρκίνου του μαστού FFPE από ασθενείς με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα με επιβεβαιωμένο διηθητικό πορογενές ή/και ενδολοβιακό καρκίνωμα. Όλα τα δείγματα ιστού απεστάλησαν στην κατάλληλη τοποθεσία για επεξεργασία. Τα 43 δείγματα εξετάστηκαν ανεξάρτητα από τρεις παθολόγους. Για κάθε δείγμα ιστού παθολογικής εξέτασης, διεξήχθη μια δοκιμαστική ανάλυση που περιλάμβανε μακροεκτομή ιστού, εξαγωγή RNA και δοκιμασία με τον Προσδιορισμό Prosigna από έναν χειριστή σε κάθε τοποθεσία με τη χρήση της καθορισμένης διαδικασίας προσδιορισμού. Το απομονωμένο RNA από κάθε δείγμα ιστού ελέγχθηκε δύο φορές σε ξεχωριστές αναλύσεις του προσδιορισμού. Κατά τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρτίδες kit απομόνωσης RNA (μία παρτίδα ανά τοποθεσία) και μία παρτίδα αντιδραστηρίων του kit προσδιορισμού. Χρησιμοποιήθηκε ένα πλακίδιο για την εξαγωγή RNA, όταν το εμβαδόν επιφάνειας του όγκου ήταν $> 100 \text{ mm}^2$ και 3 πλακίδια όταν η επιφάνεια του όγκου ήταν $< 100 \text{ mm}^2$, με ελάχιστο απαιτούμενο εμβαδόν επιφάνειας τα 4 mm^2 .

16.1.5 Περίληψη ελέγχου

Το ποσοστό λήψης αποτελεσμάτων για τα σαράντα τρία (43) δείγματα ιστού που αξιολογήθηκαν σε κάθε μία από τις τρεις τοποθεσίες παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Ποσοστό αποτελεσμάτων σε κάθε τοποθεσία

Τοποθεσία	Ποσοστό που παρείχε αποτέλεσμα	Επιτυχή/Συνολικά
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

Σαράντα δείγματα παρείχαν αποτελέσματα (χρειάστηκε επανάληψη της απομόνωσης RNA ενός δείγματος σε μία τοποθεσία), 1 δείγμα παρείχε αποτέλεσμα σε 2 τοποθεσίες και 2 δείγματα παρείχαν αποτελέσματα σε μία τοποθεσία. Ποσοστό εκατό τοις εκατό (100%) των δειγμάτων που ολοκλήρωσαν με επιτυχία την εξέταση ιστού σύμφωνα με τις προδιαγραφές απομόνωσης RNA παρείχαν επιτυχή αποτελέσματα στον Προσδιορισμό Prosigna. Το μετρηθέν εμβαδόν επιφάνειας όγκου για 4/5 αποτυχίες απομόνωσης RNA ήταν $\leq 15 \text{ mm}^2$, που ισούται με λιγότερο από 50 mm^2 του συνολικού ιστού ανά είσοδο περιοχής στον έλεγχο.

Τα 43 δείγματα περιλάμβαναν ασθενείς τόσο με αρνητικούς όσο και με θετικούς λεμφαδένες. Τα αποτελέσματα του ελέγχου που υπολογίστηκαν από τα 43 δείγματα αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο εύρος (94 μονάδες) βαθμολογιών ROR, τους 4 ενδογενείς υποτύπους και όλες τις κατηγορίες κινδύνου, κατά την εφαρμογή των τιμών αποκοπής αρνητικών ή θετικών λεμφαδένων σε όλα τα δείγματα. Τα δύο δείγματα με αποτέλεσμα σε μία τοποθεσία εξαιρέθηκαν από όλες τις στατιστικές αναλύσεις, καθώς δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για σύγκριση μεταξύ των τοποθεσιών.

16.1.6 Ανάλυση συνιστωσών απόκλισης

Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές ($\alpha = 0,05$) διαφορές μεταξύ των κατηγοριών κινδύνου κατά τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, γι' αυτό το μοντέλο συνιστωσών απόκλισης εφαρμόστηκε ταυτόχρονα σε όλες τις κατηγορίες κινδύνου.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνιστωσών απόκλισης κατά τη χρήση και των 41 δειγμάτων ιστού.

Πίνακας 14: Συνιστώσες απόκλισης (Μελέτη αναπαραγωγιμότητας ιστού)

Συνιστώσες απόκλισης				Συνολική SD
Τοποθεσία	Εντός του μπλοκ	Εναπομένουσα	Συνολικά	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Η συνιστώσα τοποθεσίας μετράει τη συστηματική απόκλιση για την τοποθεσία, η συνιστώσα «Εντός του μπλοκ» μετράει την τυχαία απόκλιση που διαφέρει συναρτησιακά με την εξέταση/επεξεργασία των δειγμάτων ιστού ή εντός της απόκλισης μπλοκ FFPE και η εναπομένουσα απόκλιση μετράει τη συνδυαστική μεταβλητότητα μεταξύ των αναλύσεων και τη μεταβλητότητα εντός της ανάλυσης στον Προσδιορισμό Prosigna. Η συνιστώσα τοποθεσίας είναι πολύ μικρή σε σχέση με την τυχαία μεταβλητότητα εντός του μπλοκ, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι διαφορές μεταξύ των τοποθεσιών ήταν αμελητέες κατά μέσο όρο (< 1% της συνολικής απόκλισης). Η εναπομένουσα απόκλιση ήταν σύμφωνη με την ισοδύναμη μεταβλητότητα που μετρήθηκε στη μελέτη ακρίβειας RNA, που είχε λιγότερα δείγματα αλλά περισσότερες πανομοιότυπες μετρήσεις (απόκλιση 0,51 σε σύγκριση με την απόκλιση παρτίδας αντιδραστηρίων Prosigna μέσης τοποθεσίας 0,39 για τη μελέτη ακρίβειας RNA).

Ο Πίνακας 15 συνοψίζει τη συνολική μεταβλητότητα στην οποία χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα της Μεταβλητότητας Επεξεργασίας Ιστού (οι συνιστώσες τοποθεσίας και εντός του μπλοκ λαμβάνονται από τον Πίνακα 14 αυτής της μελέτης), καθώς και η συνολική Μεταβλητότητα Επεξεργασίας RNA από τη μελέτη ακρίβειας RNA (μέσοι όροι από τα πέντε ελεγμένα μέλη του πάνελ στον Πίνακα 12). Οι προαναλυτικοί παράγοντες που σχετίζονται με την επεξεργασία ιστών είναι η κύρια πηγή της απόκλισης για τον έλεγχο (94% της συνολικής απόκλισης). Η συνολική τυπική απόκλιση (SD) που περιλαμβάνει όλες τις πηγές απόκλισης ισότητας με 2,9, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο Προσδιορισμός Prosigna είναι ένα αξιόπιστο μέτρο διαφοράς 6,75 μεταξύ δύο τιμών ROR με εμπιστοσύνη 95%.

Πίνακας 15: Συνολική Μεταβλητότητα (Επεξεργασίας Ιστού και RNA)

Μεταβλητότητα Επεξεργασίας Ιστού	Μεταβλητότητα Επεξεργασίας RNA	Συνολική Μεταβλητότητα	Συνολική SD
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Συμφωνία κατηγορίας κινδύνου και ταξινόμησης υπότυπου

Η συμφωνία μεταξύ τοποθεσιών κατά υπότυπο ασθενούς και κατηγορία κινδύνου (χαμηλός, μεσαίος, υψηλός κίνδυνος) παρουσιάζεται στον Πίνακα 16, όπου εφαρμόστηκαν σε όλα τα δείγματα οι αντίστοιχες τιμές αποκοπής κινδύνου για τις ταξινομήσεις αρνητικών και θετικών λεμφαδένων. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης ακριβούς τύπου 95% παρουσιάζονται μέσα σε αγκύλες και ο αριθμός των δειγμάτων με αποτελέσματα και στις δύο τοποθεσίες παρουσιάζεται μέσα σε παρενθέσεις. Η μέση συμφωνία παρουσιάζεται στην τελευταία στήλη. Για κάθε σύγκριση, η συμφωνία υπολογίστηκε σε δύο βήματα. Πρώτα, για κάθε δείγμα ιστού, υπολογίστηκε η αναλογία των τεσσάρων δυνατών ζευγών αποτελεσμάτων (δύο στην τοποθεσία 1 * δύο στην τοποθεσία 2) που παρουσίασε συμφωνία. Στο δεύτερο βήμα, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι αυτών των αναλογιών για όλα τα δείγματα ιστού που παρήγαγαν αποτελέσματα και στις δύο τοποθεσίες στη δεδομένη σύγκριση.

Πίνακας 16: Πίνακας συμφωνίας υπότυπου και κατηγορίας κινδύνου κατά κατάσταση λεμφαδένων

Τύπος σύγκρισης	Συμφωνία σύγκρισης ζευγών			Μέση συμφωνία
	Τοποθεσία 1 ως προς Τοποθεσία 2 (n = 40)	Τοποθεσία 1 ως προς Τοποθεσία 3 (n = 41)	Τοποθεσία 2 ως προς Τοποθεσία 3 (n = 40)	
Υπότυπος	96,3% [86,4%-99,5%]	98,8% [91,0% - 100%]	95% [83,1% - 99,3%]	97%
Κατηγορία κινδύνου Αρνητικού λεμφαδένα	87,5% [73,2% - 95,8%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	90% [76,4% - 97,2%]	90%
Κατηγορία κινδύνου Θετικού λεμφαδένα	88,8% [75,9% - 96,0%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	91,3% [79,2% - 97,4%]	91%

Για κάθε σύγκριση, (υπότυπος και κατηγορίες κινδύνου αρνητικών και θετικών λεμφαδένων), η μέση συμφωνία μεταξύ τοποθεσιών ήταν τουλάχιστον 90%. Δεν υπήρχαν δείγματα όταν η κατηγορία κινδύνου άλλαξε από χαμηλό σε υψηλό κίνδυνο (ή αντιστρόφως) μεταξύ ή εντός τοποθεσιών. Υπήρχαν μόνο δύο δείγματα (από τα 41) που δεν έδωσαν ίδιους υπότυπους στα 6 πανομοιότυπα δείγματα:

- Ένα δείγμα είχε διπλότυπα αποτελέσματα Αυλικού τύπου A σε μία τοποθεσία και διπλότυπα αποτελέσματα Αυλικού τύπου B σε κάθε μία από τις άλλες δύο τοποθεσίες.
- Ένα δείγμα είχε διπλότυπα αποτελέσματα Αυλικού τύπου A σε μία τοποθεσία, διπλότυπα αποτελέσματα HER2-εμπλουτισμένου τύπου σε άλλη τοποθεσία και ένα Αυλικού τύπου A και HER2-εμπλουτισμένου τύπου στην τρίτη τοποθεσία.

16.2 Ευαισθησία / Είσοδος RNA

Περιγραφή μελέτης εισόδου RNA

Στη μελέτη ελέγχθηκαν 13 δείγματα RNA καρκίνου του μαστού σε τρία επίπεδα εισόδου RNA εντός των προδιαγραφών του προσδιορισμού (500, 250 και 125 ng) και δύο πρόσθετα επίπεδα εισόδου RNA εκτός των προδιαγραφών (625, 62,5 ng). Κάθε δείγμα ελέγχθηκε με κάθε παρτίδα του κιτ (2 παρτίδες συνολικά) σε μία ανάλυση δοκιμασίας, που περιλάμβανε διπλότυπες μετρήσεις σε κάθε επίπεδο εντός των προδιαγραφών και μία μέτρηση για κάθε επίπεδο εκτός των προδιαγραφών. Σε κάθε ανάλυση περιλήφθηκαν διπλότυπες κενές μετρήσεις (δηλαδή, χωρίς στόχο). Ένα δείγμα ελέγχθηκε μόνο με μία παρτίδα.

Αποτελέσματα μελέτης εισόδου RNA

Όλα τα μετρηθέντα κενά δείγματα (n = 46) ήταν κάτω από το κατώφλι για το σήμα και παρείχαν αποτέλεσμα αποτυχίας (ποσοστό αποτελεσμάτων 0%). Όλες οι μετρήσεις RNA όγκου εντός των προδιαγραφών του προσδιορισμού (n = 138) παρείχαν επιτυχές αποτέλεσμα (ποσοστό αποτελεσμάτων 100%). Ποσοστό εκατό τοις εκατό (100%) των δειγμάτων με είσοδο άνω των προδιαγραφών (625 ng) παρείχε επιτυχές αποτέλεσμα. Ποσοστό ογδόντα τρία τοις εκατό (83%) των δειγμάτων (10/12) που ελέγχθηκαν με είσοδο κάτω από τις προδιαγραφές (62,5 ng) παρείχε αποτέλεσμα στην παρτίδα 1 με 100% στην παρτίδα 2.

Η μέση βαθμολογία ROR για τα 13 δείγματα κάλυπτε ένα μεγάλο εύρος (20–82). Η ταξινόμηση ομάδας κινδύνου (χαμηλός/μεσαίος/υψηλός) ήταν 100% σύμφωνος με όλα τα επίπεδα εισόδου RNA για τα 13 δείγματα που ελέγχθηκαν. Ο Πίνακας 17 συνοψίζει την απόκλιση στη βαθμολογία ROR ως συνάρτηση της εισόδου RNA. Η μέση διαφορά βαθμολογίας ROR μεταξύ των επιπέδων εισόδου RNA, η SD για τις διαφορές και το διάστημα εμπιστοσύνης 90% χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του εάν οι βαθμολογίες ROR που προέκυψαν από διαφορετικά επίπεδα εισόδου RNA ήταν ισοδύναμες με εκείνες που προέκυψαν με το επίπεδο στόχο 250 ng. Για να πληρείται το κριτήριο αποδοχής, το διάστημα εμπιστοσύνης έπρεπε να εμπεριέχεται πλήρως στο (-3,3 ROR). Στα δύο επίπεδα ορίων του εύρους των προδιαγραφών του προσδιορισμού (125 και 500 ng RNA), οι βαθμολογίες ROR ήταν ισοδύναμες με εκείνες στη συγκέντρωση εισόδου στόχου 250 ng για κάθε μία από τις δύο παρτίδες κιτ που ελέγχθηκαν. Για κάθε επίπεδο εκτός των προδιαγραφών, οι βαθμολογίες ROR ήταν ισοδύναμες για τη μία παρτίδα, αλλά όχι για την άλλη.

Πίνακας 17: Περιλήψη διαφορών βαθμολογίας ROR. Η μέτρηση ισότητας με τον αριθμό των δειγμάτων που περιλαμβάνονταν στην ανάλυση.

Παρτίδα κιτ	Μάζα (ng)	Μέτρηση	Μέση διαφορά ROR	SD διαφοράς	Κάτω όριο εμπιστοσύνης	Άνω όριο εμπιστοσύνης
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
20536	625 - 250	12	-0,13	0,86	-0,53	0,28
	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

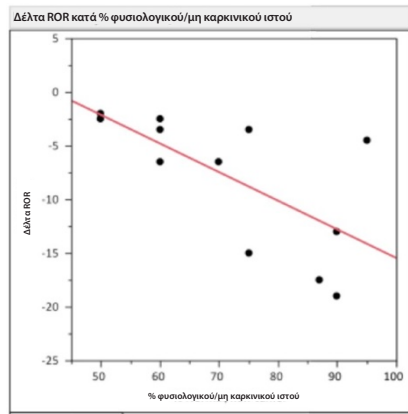
16.3 Έλεγχος παρεμβολών

Παρακείμενος φυσιολογικός/μη καρκινικός ιστός

Η παρουσία παρακείμενου φυσιολογικού/μη καρκινικού ιστού είναι συνηθισμένη σε μπλοκ καρκίνου του μαστού FFPE και μπορεί να προσδιοριστεί με την παθολογική εξέταση ως διακριτή περιοχή από την περιοχή του διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές της διαδικασίας του Προσδιορισμού Prosigna παραπάνω, η αφαίρεση του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού γίνεται με μακροεκτομή. Για τον προσδιορισμό του κινδύνου μόλυνσης των αποτελεσμάτων από φυσιολογικό ιστό, ελέγχθηκαν 13 μπλοκ όγκου καρκίνου του μαστού FFPE που περιείχαν παθολογικά επεμβασιωμένο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα και περίπου 50–95% περιβάλλοντα φυσιολογικό/μη καρκινικό ιστό με και χωρίς μακροεκτομή του περιβάλλοντος ιστού και καθορίστηκε η διαφορά στη βαθμολογία ROR (δέλτα ROR).

Κατά μέσο όρο, η βαθμολογία ROR του δείγματος όγκου που υπέστη μακροεκτομή ήταν κατά 8 περίπου μονάδες ROR πάνω από τη βαθμολογία που παρατηρήθηκε κατά τη διατήρηση του φυσιολογικού/μη καρκινικού ιστού. Η Εικόνα 14 δείχνει ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα φυσιολογικού ιστού (ποσοστό ιστού που δεν έχει αφαιρεθεί με μακροεκτομή έως 95%), υπάρχει αυξανόμενος κίνδυνος η αναφερόμενη βαθμολογία ROR να υπο-εκτιμάει ή να εκτιμάει με αρνητική απόκλιση (έως -19 μονάδες ROR) τον κίνδυνο υποτροπής μίας ασθενούς.

Εικόνα 14: Επίδραση φυσιολογικού/μη καρκινικού ιστού στο Δέλτα ROR



Παρεμβολές νεκρωτικού, αιμορραγικού και μη διηθητικού πορογενούς καρκινικού (DCIS) ιστού

Για τον προσδιορισμό του κινδύνου μόλυνσης των αποτελεσμάτων από νεκρωτικό/αιμορραγικό/μη διηθητικό πορογενή καρκινικό (DCIS) ιστό, ελέγχθηκαν 11 μπλοκ καρκίνου του μαστού FFPE (3 DCIS, 5 νεκρωτικά, 3 αιμορραγικά) που περιείχαν παθολογικά επιβεβαιωμένο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού και περίπου 10-30% παρεμβάλλοντα ιστού με και χωρίς μακροεκτομή του παρεμβάλλοντος ιστού και καθορίστηκε η διαφορά στη βαθμολογία ROR (δέλτα ROR). Στα επίπεδα ελέγχου, η επίδραση του νεκρωτικού, αιμορραγικού και μη διηθητικού πορογενούς καρκινικού (DCIS) ιστού που περιλήφθηκε στη διαδικασία ήταν αμελητέα στην αναφερόμενη βαθμολογία ROR (< 6 μονάδες ROR). Παρατηρήθηκε συμφωνία 100% στην εκχώρηση της κατηγορίας κινδύνου μεταξύ των έντεκα νεκρωτικών, αιμορραγικών και μη διηθητικών πορογενών καρκινικών (DCIS) ιστών με και χωρίς μακροεκτομή.

Ανθρώπινο γενωμικό DNA

Η διαδικασία του Προσδιορισμού Prosigna περιλαμβάνει την αφαίρεση του ανθρώπινου γενωμικού DNA (gDNA) μέσω αφομίωσης με DNase. Για να αξιολογηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης των αποτελεσμάτων από το gDNA, ελέγχθηκαν δέκα (10) μπλοκ όγκου καρκίνου του μαστού FFPE που περιείχαν παθολογοανατομικά επιβεβαιωμένο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα με +/- αφαίρεση του ανθρώπινου γενωμικού DNA, παραλείποντας το βήμα Δεοξυριβονουκλεάσης (DNase) στη διαδικασία. Στα δείγματα που ελέγχθηκαν, κατά μέσο όρο, η βαθμολογία ROR ήταν χαμηλότερη κατά 4 έως 5 μονάδες στις ομάδες χαμηλού και μεσαίου κινδύνου, όταν το gDNA αφαιρέθηκε με DNaseI (βλ. Πίνακα 18). Όταν τα δείγματα χωρίς επεξεργασία DNase υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε επεξεργασία με DNase I (μετά την επεξεργασία), οι βαθμολογίες ROR συμφωνούσαν με τις τιμές ROR που είχαν παρατηρηθεί αρχικά με την επεξεργασία DNase I βάσει του πρωτοκόλλου. Υπάρχει κίνδυνος η αναφερόμενη βαθμολογία ROR να υπερ-εκτιμάει ή να εκτιμάει με θετική απόκλιση (έως 7 μονάδες ROR) τον κίνδυνο υποτροπής της ασθενούς παρουσία του gDNA. Επιπρόσθετα, το υπολογιζόμενο σήμα για δείγματα χωρίς επεξεργασία με DNase I ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) χαμηλότερο από εκείνα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με DNase I λόγω των παρεμβολών στην ένδειξη απορρόφησης που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας RNA πριν από τη δοκιμασία με τον Προσδιορισμό Prosigna.

Πίνακας 18: Επίδραση της επεξεργασίας με Δεοξυριβονουκλεάση στη βαθμολογία ROR σε δείγματα ιστού

ROR Κατηγορία	Δείγματα FFPE που ελέγχθηκαν	Διαφορά ROR με DNase I - χωρίς DNase I			Διαφορά ROR με DNase I - χωρίς DNase I (μετά την επεξεργασία)		
		Μέση	Ελάχ.	Μέγ.	Μέση	Ελάχ.	Μέγ.
Χαμηλός	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Μεσαίος	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Υψηλός	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Κλινική απόδοση

Διεξήχθησαν δύο κλινικές μελέτες επικύρωσης προκειμένου να επικυρωθεί ο Προσδιορισμός γονιδιακής προγνωστικής υπογραφής καρκίνου του μαστού Prosigna. Ο κύριος στόχος και των δύο μελετών ήταν η επικύρωση των δημοσιευμένων παρατηρήσεων σχετικά με το ότι η βαθμολογία του κινδύνου υποτροπής (ROR) παρέχει πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών. Επίσης, δευτερεύων στόχος και των δύο μελετών ήταν η επικύρωση προηγούμενων παρατηρήσεων σχετικά με το ότι οι ασθενείς Αυλικού τύπου Α και Αυλικού τύπου Β έχουν στατιστικά σημαντική διαφορετική επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη. Καθώς τα κριτήρια εισόδου και τα αποτελέσματα αυτών των δύο μελετών ήταν παρόμοια, οι δύο βάσεις δεδομένων συνδυάστηκαν και αναλύθηκαν με προοπτικά ορισμένο σχήμα ανάλυσης που είχε τους ίδιους στόχους με τις μεμονωμένες μελέτες.

Συνδυαστική ανάλυση: Δημιουργία καμπυλών κινδύνου με τη χρήση συνδυαστικών αποτελεσμάτων του Προσδιορισμού Prosigna από TransATAC και ABCSG-8

Παρακάτω δίνεται η περίληψη των χαρακτηριστικών αγωγής και των κλινικών χαρακτηριστικών από τη συνδυαστική ανάλυση. Για τις μεμονωμένες πληροφορίες σχετικά με τη σχεδίαση της μελέτης και την ανάλυση, ανατρέξτε στις ακόλουθες ενότητες για τις Μελέτες 1 και 2 αντίστοιχα.

Ανάλυση

Πίνακας 19: Περίληψη χαρακτηριστικών αγωγής και κλινικών χαρακτηριστικών στη συνδυαστική ανάλυση των Μελετών 1 και 2

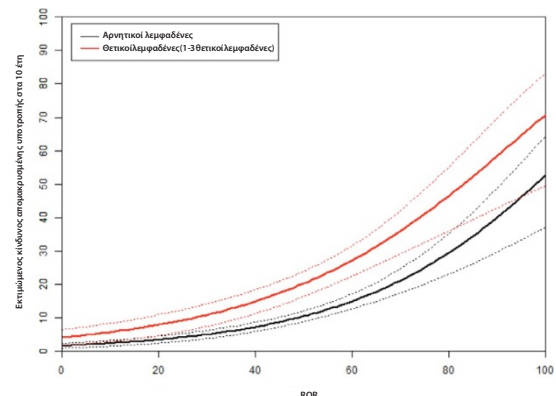
Χαρακτηριστικό	Τιμή	Αρνητικοί λεμφαδένες (n = 1.786)		1-3 Θετικοί λεμφαδένες (n = 590)		≥ 4 Θετικοί λεμφαδένες (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1.047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Αγωγή	Μερική αναστροζόλη	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Μόνο ταμοξифαίνη	362 (49,0%)	519 (49,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
Κατάσταση	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%)
Μέγεθος όγκου	≤ 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%)
Κατάσταση HER2	Αρνητική	649 (87,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	367 (96,1%)	47 (87,0%)	46 (93,9%)
	Θετική	90 (12,2%)	63 (6,0%)	22 (10,6%)	15 (3,9%)	7 (13,0%)	3 (6,1%)
Υποτροπές	Μετάσταση	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Οποιαδήποτε	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	73 (19,1%)	34 (63,0%)	10 (20,4%)
Ενδογενής υπότυπος NanoString	Αυλικού τύπου Α	529 (71,6%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Αυλικού τύπου Β	176 (23,8%)	284 (27,1%)	68 (32,7%)	118 (30,9%)	20 (37%)	16 (32,7%)
	Βασικού τύπου	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2-εμπλουτισμένος	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Και οι δύο μελέτες είχαν σκέλος αγωγής με ταμοξифαίνη για 5 έτη. Στην TransATAC, το σκέλος της άλλης μελέτης περιλάμβανε 5 έτη αναστροζόλης, ενώ στη μελέτη ABCSG-8, το δεύτερο σκέλος περιλάμβανε 2 έτη ταμοξифαίνης και κατόπιν 3 έτη αναστροζόλης. Κατά τη μοντελοποίηση του κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής (DR) συναρτήσκει όλων των κλινικών μεταβλητών και μεταβλητών αγωγής, η αγωγή δεν συνέβαλε σημαντικά ($p = 0,66$) στη πρόγνωση του DR. Οι άλλες κύριες διαφορές μεταξύ αυτών των δοκιμών ήταν το γεγονός ότι η δοκιμή TransATAC περιλάμβανε ασθενείς με όγκους κατάταξης 3 και ότι το συνολικό ποσοστό υποτροπής ήταν υψηλότερο στη μελέτη TransATAC σε σχέση με τη μελέτη ABCSG-8.

Αποτελέσματα

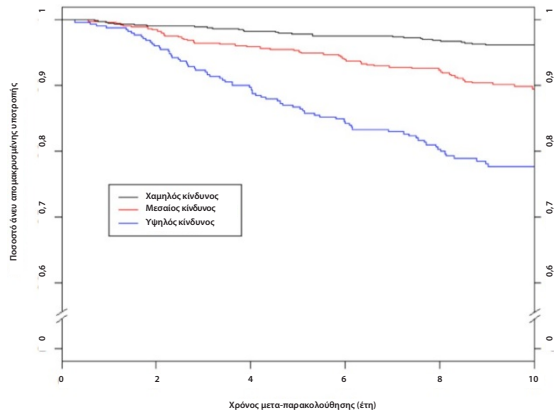
Η Εικόνα 15 δείχνει τον κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη συναρτήσκει της βαθμολογίας ROR με ζώνες εμπιστοσύνης 95% βάσει ξεχωριστών αναλόγων προς Cox μοντέλων κινδύνου για κάθε ομάδα ασθενών με αρνητικούς και θετικούς (1-3) λεμφαδένες.

Εικόνα 15: Εκτιμώμενος κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%



Η Εικόνα 16 δείχνει τα διαγράμματα Kaplan-Meier και συμβάντων κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και η Εικόνα 17 δείχνει τα ίδια διαγράμματα για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες. Σε κάθε εικόνα, παρέχονται λεπτομέρειες για το μέγεθος δειγμάτων, τον αριθμό των συμβάντων και το εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη κατά ομάδα κινδύνου. Στην ομάδα ασθενών με θετικούς λεμφαδένες, υπήρχαν πολύ λίγες ασθενείς στις προκαθορισμένες ομάδες χαμηλού κινδύνου με αποτέλεσμα το διάστημα εμπιστοσύνης στην καμπύλη Kaplan-Meier και κατά συνέπεια η εκτίμηση της επιβίωσης άνευ απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη (DRFS) να είναι ευρεία.

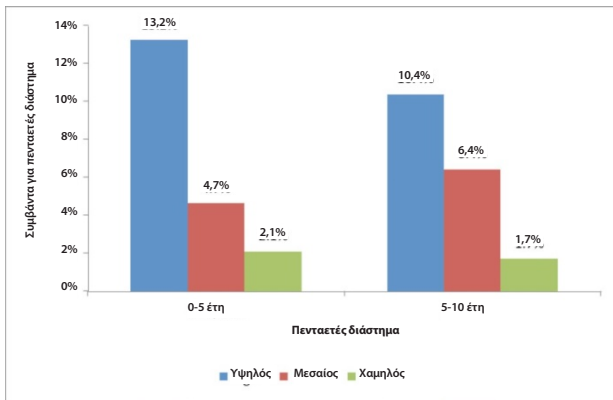
Εικόνα 16A: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



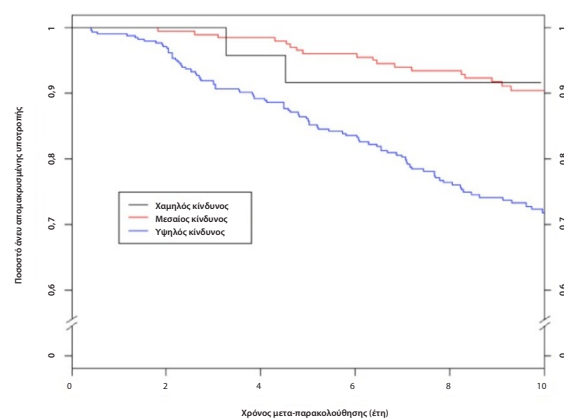
Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 16A: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Μεσαίος	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Υψηλός	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Συνολικά	1.786 (100%)	157	

Εικόνα 16B: Συμβάντα κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες σε πενταετή διαστήματα



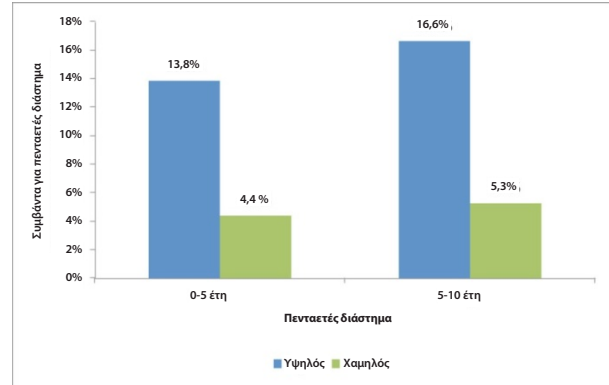
Εικόνα 17A: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 17A: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Μεσαίος	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Υψηλός	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Συνολικά	590 (100%)	107	

Εικόνα 17B: Συμβάντα κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες σε πενταετή διαστήματα



Στην Εικόνα 17B, καθώς υπήρχαν μόνο 24 ασθενείς με 2 συμβάντα στην ομάδα θετικών λεμφαδένων χαμηλού κινδύνου, αυτές οι ασθενείς συνδυάστηκαν με τις ασθενείς μεσαίου κινδύνου για την ανάλυση όψιμης υποτροπής.

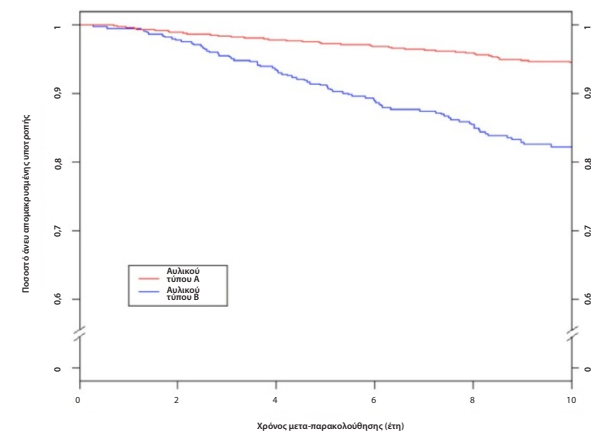
Και οι 103 ασθενείς στη συνδυαστική βάση δεδομένων με 4 ή περισσότερους θετικούς λεμφαδένες ταξινομούνται ως υψηλού κινδύνου. Ο Πίνακας 20 δείχνει τα ποσοστά DRFS στα 10 έτη για αυτές τις ασθενείς.

Πίνακας 20: Ποσοστά DRFS στα 10 έτη για ασθενείς με 4 και άνω θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Υψηλός	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

Η πλειοψηφία των υποκειμένων στις συνδυαστικές μελέτες (96%) ήταν είτε Αυλικού τύπου Α είτε Αυλικού τύπου Β. Η Εικόνα 18 δείχνει τη σύγκριση του DRFS κατά Αυλικό τύπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες.

Εικόνα 18: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

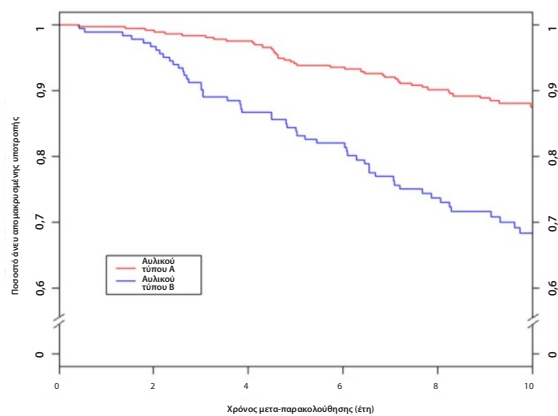


Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 18: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Αυλικού τύπου A	1254	62	94,6 [93,1 - 95,8]
Αυλικού τύπου B	460	75	81,9 [77,7 - 85,3]
Συνολικά	1.714	137	

Η Εικόνα 19 δείχνει την ίδια σύγκριση για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες. Και για τις δύο ομάδες, υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του DRFS των ασθενών Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B.

Εικόνα 19: Καμπύλες Kaplan-Meier για DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 19: Καμπύλες Kaplan-Meier για DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Αυλικού τύπου A	375	41	87,6 [83,5 - 90,8]
Αυλικού τύπου B	186	52	68,3 [60,4 - 75,0]
Συνολικά	561	93	

Υπήρχαν μόνο 98 ασθενείς με καρκίνο Αυλικού υποτύπου στη συνδυαστική βάση δεδομένων με 4 και άνω θετικούς λεμφαδένες. Ο Πίνακας 21 δείχνει τα ποσοστά DRFS στα 10 έτη για αυτές τις ασθενείς, οι οποίες επίσης παρουσιάζουν πολύ υψηλότερο κίνδυνο όταν έχουν καρκίνο Αυλικού τύπου B.

Πίνακας 21: Ποσοστά DRFS στα 10 έτη για ασθενείς με 4 και άνω θετικούς λεμφαδένες κατά Αυλικό υπότυπο

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Αυλικού τύπου A	62	17	68,3 [53,6 - 79,3]
Αυλικού τύπου B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
Συνολικά	98	37	

Ανάλυση όψιμης υποτροπής

Στα συνδυαστικά δεδομένα ανάλυσης που περιγράφηκαν πρωτίτερα, τα ποσοστά συμβάντων σε κάθε ομάδα κινδύνου δεν είναι σταθερά στο διάστημα 10 ετών, όπως διαπιστώνεται στις Εικόνες 16B και 17B. Για να κατανοηθεί περαιτέρω η απομακρυσμένη υποτροπή στην περίοδο όψιμης υποτροπής, διεξήχθη μια εκ των υστέρων αναδρομική ανάλυση των συνδυαστικών δεδομένων που περιγράφηκαν παραπάνω για το υποσύνολο ασθενών που δεν παρουσίασαν απομακρυσμένη υποτροπή στα πέντε έτη (συνολικά 2.163 ασθενείς). Από αυτές τις ασθενείς, οι 1.605 είχαν αρνητικούς λεμφαδένες και 488 είχαν θετικούς λεμφαδένες (1-3 θετικούς λεμφαδένες). Για κάθε ομάδα λεμφαδένων, οι τιμές κάτω από τον άξονα X το έτος 5 στις εικόνες 20 και 21 δείχνουν τον αριθμό ασθενών κατά ομάδα κινδύνου στα πέντε έτη, π.χ. επιλέξιμες για την ανάλυση όψιμης υποτροπής.

Ο Πίνακας 22 παρέχει μια περίληψη των χαρακτηριστικών αγωγής και των κλινικών χαρακτηριστικών για τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες) στην ανάλυση όψιμης υποτροπής.

Πίνακας 22: Περίληψη χαρακτηριστικών αγωγής και κλινικών χαρακτηριστικών για την ανάλυση όψιμης υποτροπής

Χαρακτηριστικό	Τιμή	Αρνητικοί λεμφαδένες (n = 1.605)		Θετικοί λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Αγωγή	Μερική αναστροζόλη	480	346	153	89
	Μόνο ταμοξιφαίνη	464	315	158	88
Κατάταξη	Καλή	192	158	46	36
	Μέτρια	752	394	265	105
	Κακή	0	109	0	36
Μέγεθος όγκου	≤ 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
Κατάσταση HER2	Αρνητική	888	590	300	157
	Θετική	56	71	11	20
Υποτροπές	Απομακρυσμένη	41	40	28	29
	Οποιαδήποτε	71	78	37	37
Ενδογενής υπότυπος NanoString	Αυλικού τύπου A	674	488	218	112
	Αυλικού τύπου B	245	150	87	54
	Βασικού τύπου	4	5	0	1
	HER2-εμπλουτισμένος	21	18	6	10

Ο κύριος στόχος ήταν να αξιολογηθεί η δυνατότητα της βαθμολογίας ROR να παρέχει σημαντικές, πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες για το DRFS πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών στα έτη 5 έως 10. Συγκρίθηκε ένα μοντέλο μηδενός που περιλάμβανε μόνο τη βαθμολογία CTS με ένα εναλλακτικό μοντέλο που περιλάμβανε τις βαθμολογίες CTS και ROR με τη χρήση μιας δοκιμής αναλογίας πιθανοτήτων (LR). Η βαθμολογία ROR πρόσθεσε στατιστικά σημαντικές πληροφορίες για το DRFS μετά τα 5 έτη πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών για όλες τις ασθενείς ($p < 0,0001$), καθώς και για τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες ($p < 0,0001$) και τις ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες) ($p < 0,0001$).

Ο Πίνακας 23 δείχνει την περίληψη των αναλογιών κινδύνων για μια μεταβολή 10 βαθμών με βάση μια μονομεταβλητή ανάλυση και μια πολυμεταβλητή ανάλυση που περιλάμβανε τόσο τη βαθμολογία ROR όσο και τη βαθμολογία CTS. Οι αναλογίες κινδύνων για τη βαθμολογία ROR έχουν όλες σημαντική διαφορά από το 1 ακόμα και μετά την προσαρμογή για τη βαθμολογία CTS. Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται επίσης οι δείκτες C. Για και τις δύο ομάδες, ο δείκτης C είχε σημαντική διαφορά από την τιμή απουσίας πληροφοριών του 0,5.

Πίνακας 23: Περίληψη του ελέγχου όψιμης υποτροπής

Αριθμός θετικών λεμφαδένων	N	Αναλογία κινδύνου: Μεταβολή βαθμολογίας ROR κατά 10 βαθμούς		Δείκτης C με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης		
		Μονομεταβλητή ανάλυση	Πολυμεταβλητή ανάλυση	Δείκτης C	Κάτω	Άνω
0	1.605	1,38 [1,23-1,54]	1,29 [1,15-1,46]	70,1%	64,7%	75,5%
1-3	488	1,43 [1,25-1,63]	1,34 [1,16-1,53]	71,1%	64,0%	78,3%

Η πλειοψηφία των ασθενών στις δύο μελέτες είχαν HER2 αρνητικό. Ο Πίνακας 24 δείχνει την κατανομή της κατάστασης του HER2 για τις γυναίκες με αρνητικούς λεμφαδένες και με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες). Και για τις δύο ομάδες, πάνω από το 90% των γυναικών στις μελέτες είχαν HER2 αρνητικό.

Πίνακας 24: Κατανομή της Κατάστασης του HER2 κατά αριθμό θετικών λεμφαδένων

Υποσύνολο ασθενών	Κατάσταση HER2		Συνολικά
	Αρνητική	Θετική	
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες	1.478 (92,1%)	127 (7,9%)	1.605
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες με 1-3 θετικούς λεμφαδένες	457 (93,6%)	31 (6,4%)	488

Ο Πίνακας 25 δείχνει μια σύγκριση του πολυμεταβλητού μοντέλου που εφαρμόστηκε σε όλες τις ασθενείς σε μια δεδομένη ομάδα λεμφαδένων και το μοντέλο που εφαρμόστηκε σε όλες τις ασθενείς με HER2 αρνητικό στην ομάδα. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

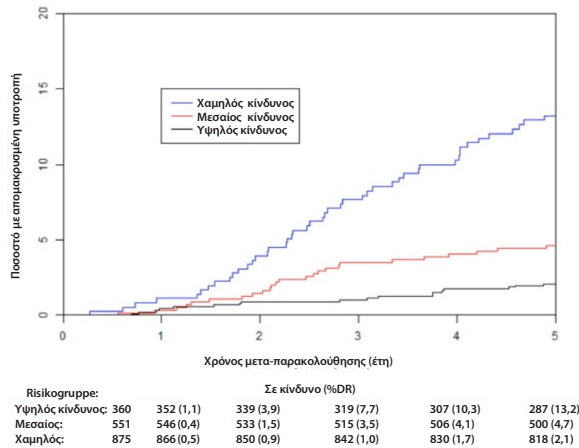
Πίνακας 25: Πολυμεταβλητές αναλογίες κινδύνου για μεταβολή βαθμολογίας ROR κατά 10 βαθμούς: Όλες οι ασθενείς στην υποομάδα έναντι των ασθενών με HER2 αρνητικό στην υποομάδα

Αριθμός θετικών λεμφαδένων	Όλες οι ασθενείς [95% CI]	Ασθενείς με HER2 αρνητικό [95% CI]
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες με 1-3 θετικούς λεμφαδένες	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Η σύγκριση των ομάδων κινδύνου εξετάζεται περαιτέρω στις Εικόνες 20 και 21, που δείχνουν τις καμπύλες συμβάντων για πρώτη και όψιμη απομακρυσμένη υποτροπή, που έχουν δημιουργηθεί κατά ομάδα κινδύνου σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες), αντίστοιχα. Οι καμπύλες συμβάντων καλύπτουν την περίοδο πρώιμης υποτροπής (τα πρώτα 5 έτη) και την περίοδο όψιμης υποτροπής (από 5 έως 10 έτη μετά τη διάγνωση). Ακριβώς κάτω από τον άξονα X σε κάθε εικόνα, παρουσιάζεται ο αριθμός των γυναικών σε κίνδυνο και τα συνολικά συμβάντα. Οι πίνακες περιληψής κάτω από τις εικόνες δείχνουν τα διαστήματα εμπιστοσύνης για το συνολικό ποσοστό DR στα 5 έτη ή στα 10 έτη για τις γυναίκες που δεν είχαν απομακρυσμένη υποτροπή μετά από την ολοκλήρωση της 5ετούς αγωγής. Για τις ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες) που αντιπροσωπεύονται στην Εικόνα 21, οι ομάδες χαμηλού και μεσαίου κινδύνου συνδυάστηκαν λόγω του μικρού αριθμού ασθενών στην ομάδα χαμηλού κινδύνου.

Ο πληθυσμός χαμηλού κινδύνου έχει χαμηλή πιθανότητα υποτροπής ανάμεσα στα 5 και 10 έτη μετά από 5ετή ενδοκρινική θεραπεία, όπως καταδεικνύεται από τις καμπύλες συνολικών συμβάντων και τις σχετικές αναλογίες κινδύνου για κάθε ομάδα κινδύνου. Αντίθετα, οι πληθυσμοί μεσαίου και υψηλού κινδύνου έχουν μόνιμο κίνδυνο όψιμης απομακρυσμένης υποτροπής μετά από 5ετή ενδοκρινική θεραπεία. Η διαφορά στο αποτέλεσμα μεταξύ των πληθυσμών μεσαίου και υψηλού κινδύνου με αρνητικούς λεμφαδένες δημιουργείται τα 5 πρώτα έτη (ποσοστό DR = 13,2% [9,6% - 16,7%] για τις ασθενείς υψηλού κινδύνου και 4,7% [2,9% - 6,4%] για τις ασθενείς μεσαίου κινδύνου) και παραμένει έως τα 10 έτη. Ωστόσο, τα ποσοστά υποτροπής για τις ομάδες μεσαίου και υψηλού κινδύνου μετά από 5ετή ενδοκρινική θεραπεία είναι παρόμοια.

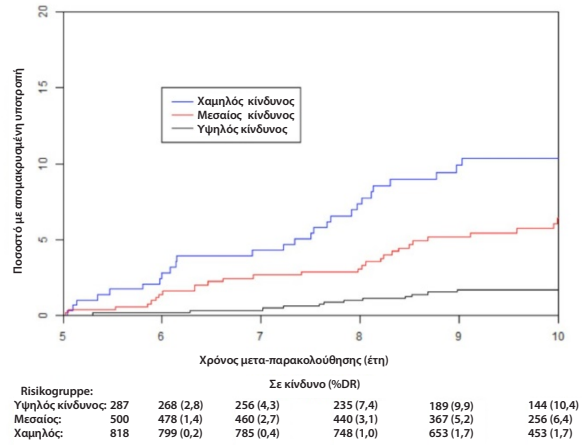
Εικόνα 20A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 0-5 έτη: Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 20A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 0-5 έτη: Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ποσοστά DR κατά ομάδα κινδύνου σε διάστημα ολοκλήρωσης της αγωγής έως 5 ετών [Διαστήματα εμπιστοσύνης 95%]		
Υψηλός	Μεσαίος	Χαμηλός
13,2% [9,6% - 16,7%]	4,7% [2,9% - 6,4%]	2,1% [1,1% - 3,1%]

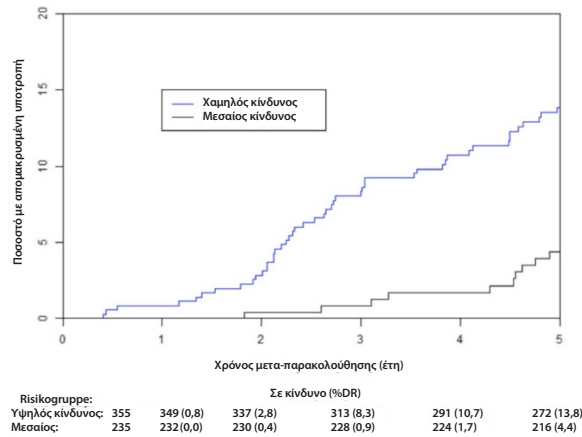
Εικόνα 20B: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 5-10 έτη: Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 20A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 5-10 έτη: Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ποσοστά DR κατά ομάδα κινδύνου πέντε έτη μετά την ολοκλήρωση της αγωγής χωρίς απομ. υποτροπή [Διαστήματα εμπιστοσύνης 95%]		
Υψηλός	Μεσαίος	Χαμηλός
10,4% [6,6% - 14%]	6,4% [4,1% - 8,7%]	1,7% [0,8% - 2,6%]

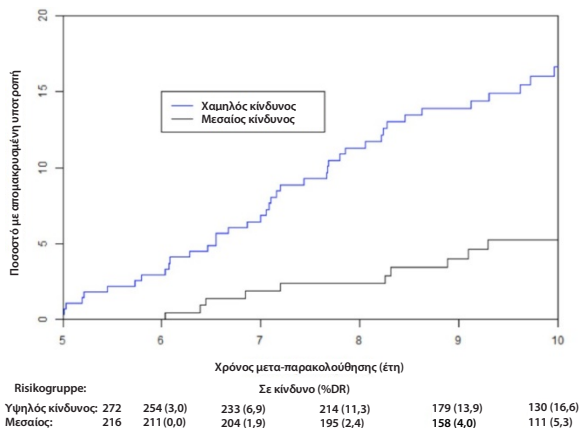
Εικόνα 21A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 0-5 έτη: Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες)



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 21A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 0-5 έτη: Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες)

Ποσοστά DR κατά ομάδα κινδύνου σε διάστημα ολοκλήρωσης της αγωγής έως 5 ετών [Διαστήματα εμπιστοσύνης 95%]	
Υψηλός	Χαμηλός / Μεσαίος
13,8% [10,1% - 17,4%]	4,4% [1,7% - 7,0%]

Εικόνα 21B: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 5-10 έτη: Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες)



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 21A: Καμπύλες συμβάντων απομακρυσμένης υποτροπής κατά ομάδα κινδύνου από 5-10 έτη: Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 Λεμφαδένες)

Ποσοστά DR κατά ομάδα κινδύνου πέντε έτη μετά την ολοκλήρωση της αγωγής χωρίς απομ. υποτροπή [Διαστήματα εμπιστοσύνης 95%]	
Υψηλός	Χαμηλός / Μεσαίος
16,6% [11,7% - 21,3%]	5,3% [2,0% - 8,4%]

Συμπεράσματα συνδυαστικής ανάλυσης

Αποδείχθηκε ότι η βαθμολογία ROR προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες στην περίοδο όψιμης υποτροπής από 5 έως 10 έτη μετά τη διάγνωση και πάνω από τις τυπικές κλινικές μεταβλητές στη συνδυαστική ανάλυση για ασθενείς που δεν είχαν απομακρυσμένη υποτροπή στα πέντε έτη. Με τη χρήση των ομάδων κινδύνου που ορίστηκαν στη γραμμική αναφοράς για κάθε κοόρτη συγκεκριμένου πλήθους λεμφαδένων, οι ομάδες κινδύνου φάνηκε ότι ταξινομούν το πλήρες σύνολο των ασθενών σε ομάδες με σημαντικά διαφορετικό κίνδυνο όψιμης απομακρυσμένης υποτροπής. Οι αναλύσεις ομάδας κινδύνου τόσο της συνεχούς βαθμολογίας όσο και της βαθμολογίας ROR έδειξαν παρόμοιες προγνωστικές πληροφορίες σε διάφορες υποομάδες. Δεν διαπιστώθηκαν ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα από τις ασθενείς με HER2 αρνητικό σε σύγκριση με όλες τις ασθενείς.

Και στις δύο μελέτες TransATAC και ABCSG-8, το ROR αποδείχθηκε ότι προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών και μεταβλητών αγωγής, τόσο όταν συμπεριλαμβάνεται ως συνεχής μέτρηση όσο και όταν περιλαμβάνεται στη χρήση στην προκαθορισμένη ομάδων κινδύνου. Οι δύο μελέτες είχαν διαφορετικά προφίλ κινδύνου με την έννοια ότι το ποσοστό συμβάντων ήταν υψηλότερο στη μελέτη TransATAC σε σχέση με τη μελέτη ABCSG-8: αυτό γίνεται σαφές συγκρίνοντας το DRFS (%) στα σκέλη ελέγχου ATAC (90,8%) και ABCSG8 (92,5%) που αναφέρονται στη βιβλιογραφία^{9, 10}. Αυτή η ανάλυση συνδυάζει τα δεδομένα από τις δύο μελέτες χρησιμοποιώντας ίσες βαρύτητες για τη δημιουργία των προφίλ κινδύνου που αναμένονται να είναι πιο γενικεύσιμα σε άλλους πληθυσμούς ασθενών σε σχέση με τα αποτελέσματα από μεμονωμένες μελέτες.

Μελέτη 1: Πρόγνωση κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα και πρώιμου σταδίου με αρνητικούς ή θετικούς λεμφαδένες που έλαβαν Arimidex ή Ταμοξифαίνη: μια μελέτη TransATAC

Σχεδιαση μελέτης

Η κλινική μελέτη επικύρωσης σχεδιάστηκε έτσι ώστε να επικυρώνει ότι η βαθμολογία κινδύνου υποτροπής (ROR) παρέχει πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής (DRFS) πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών χρησιμοποιώντας όλα τα διαθέσιμα δείγματα ασθενών. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε RNA που απομονώθηκε από ιστό καρκίνου του μαστού FFPE από ένα υποσύνολο ασθενών που συμμετείχε στη δοκιμή ATAC¹¹. Η δοκιμή ATAC συμπεριλάμβανε 9.366 ασθενείς σε τρία σκέλη (1:1:1) όπου οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λαμβάνουν ενδοκρινική θεραπεία για 5 έτη με 1 mg αναστροζόλη (δηλ., arimidex) συν εικονικό φάρμακο ταμοξифαίνης, 20 mg ταμοξифαίνης συν εικονικό φάρμακο αναστροζόλης ή συνδυασμό ταμοξифαίνης/αrimidex. Η ομάδα συνδυαστικής αγωγής διακόπηκε μετά την αρχική ανάλυση, επειδή δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική ούτε ανεκτή σε σχέση με τη χορήγηση μόνο ταμοξифαίνης. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι μια μέση μετα-παρακολούθηση 10 ετών των σκελών μονοθεραπείας της δοκιμής ATAC ικανοποιεί τις απαιτήσεις FDA για ενημερωμένες πληροφορίες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας⁹. Για τις ασθενείς θετικού ορμονικού υποδοχέα, υπήρξε σημαντική βελτίωση στο DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) και DRFS (HR = 0,85) για τις ασθενείς που έλαβαν αναστροζόλη σε σύγκριση με την ταμοξифαίνη σε αυτήν την ανάλυση. Οι απόλυτες διαφορές στην επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής μεταξύ της αναστροζόλης και της ταμοξифαίνης αυξήθηκαν στην πάροδο του χρόνου από 2,7% σε 5 έτη σε 4,3% στα 10 έτη. Το πρόγραμμα TransATAC ξεκίνησε το 2002 σύμφωνα με το πρωτόκολλο TA/01 για τη δημιουργία μιας τράπεζας ιστών από αρχειοθετημένα ιστοπαθολογικά μπλοκ FFPE από ασθενείς ATAC αντίστοιχα¹¹.

Συνολικά λήφθηκαν 2.006 μπλοκ από 4.160 γυναίκες με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα, που τυχαιοποιήθηκαν στα σκέλη μονοθεραπείας της δοκιμής ATAC. Από αυτά τα μπλοκ FFPE, τα 1.372 συλλέχθηκαν από ασθενείς στο Ηνωμένο Βασίλειο και περιείχαν επαρκή διηθητικό όγκο για ανάλυση με τη δοκιμασία Genomic Health® Oncotype Dx^{®12}. Η βαθμολογία Recurrence Score® (RS) της δοκιμασίας Oncotype Dx καθορίστηκε από τα μπλοκ FFPE και τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσαν κλινικά το RS για την εκτίμηση της επιβίωσης άνευ απομακρυσμένης υποτροπής σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με καρκίνο του μαστού HR+, που έλαβαν αναστροζόλη ή ταμοξифαίνη. Το εναπομένον RNA από τη μελέτη Oncotype Dx αποστάλθηκε στο νοσοκομείο Royal Marsden Hospital στο Λονδίνο, όπου φυλάχτηκε στους -70°C. Συνολικά, 1.017 ασθενείς από τη μελέτη Oncotype Dx είχαν εναπομένον RNA > 500 ng και ελέγχθηκαν από την NanoString ως τμήμα της κλινικής μελέτης επικύρωσης της NanoString.

Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε τους ενδογενείς υπότυπους που παρήγαγε ο προσδιορισμός και εκτίμησε δύο εκδοχές της βαθμολογίας ROR χρησιμοποιώντας μια προκαθορισμένη σειριακή προσέγγιση. Οι δύο διαφορετικές βαθμολογίες ROR, η κάθε μία εκ των οποίων κυμαίνεται στο εύρος 0-100, υπολογίστηκαν με τη χρήση είτε και των 50 γονιδίων όπως έχει ήδη δημοσιευτεί¹² είτε ενός υποσυνόλου 46 γονιδίων. Σε κάθε περίπτωση, οι συντελεστές υπολογίστηκαν από ένα μοντέλο Cox που περιλαμβάνει το συσχετισμό Pearson με τα 50 ή 46 γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό κάθε ενδογενούς υποτύπου, μια βαθμολογία πολλαπλασιασμού και το μέγεθος του όγκου. Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν σε δεδομένα μετα-παρακολούθησης 10 ετών.

Το κύριο καταληκτικό σημείο ήταν η επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής (DRFS). Αυτή η παράμετρος ορίστηκε ως το διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την απομακρυσμένη υποτροπή ή το θάνατο λόγω του καρκίνου του μαστού. Το δευτερεύον καταληκτικό σημείο ήταν η επιβίωση άνευ υποτροπής (RFS). Αυτή η παράμετρος ορίστηκε ως το διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την πρώτη υποτροπή (τοπική, περιοχική ή απομακρυσμένη) ή το θάνατο λόγω του καρκίνου του μαστού.

Χρησιμοποιώντας όλα τα διαθέσιμα δείγματα ασθενών, εφαρμόστηκαν πολυμεταβλητά, αναλογικά μοντέλα κινδύνου Cox (PH) για την αξιολόγηση του κύριου στόχου σε διαδοχικούς ελέγχους της βαθμολογίας ROR βάσει 50 και 46 γονιδίων. Το μοντέλο συμπεριλάμβανε τις τυπικές κλινικές μεταβλητές (ηλικία, ταξινόμηση όγκου, μέγεθος όγκου, κατάσταση λεμφαδένων, επικουρική θεραπεία). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ένα μοντέλο Cox και χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμή αναλογίας πιθανοτήτων για να ελεγχθεί εάν το ROR προσθέτει στατιστικά σημαντικές ($\alpha = 0,05$) πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες πέραν εκείνων που περιλαμβάνονταν στη βαθμολογία Clinical Treatment Score (CTS). Η βαθμολογία CTS είναι ένας βελτιστοποιημένος συνδυασμός κλινικοπαθολογικών παραγόντων που έχει αναπτυχθεί από τον κλινικό ερευνητή ως μέτρο τυπικής παθολογίας¹². Οι κύριες αναλύσεις επαναλήφθηκαν για διαφορετικά υποσύνολα ασθενών (όλα, αρνητικοί λεμφαδένες, θετικοί λεμφαδένες ή HER2-αρνητικά) και καταληκτικά σημεία (DRFS ή RFS).

Για κάθε μία από τις ασθενείς με αρνητικούς και θετικούς λεμφαδένες, χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα Cox (εκτός από CTS) για την πρόβλεψη του κινδύνου DR στα 10 έτη συναρτήσει του ROR. Με βάση αυτές τις πρόβλεψεις μοντέλων, ορίστηκαν τρεις ομάδες κινδύνου:

Χαμηλός κίνδυνος:	πιθανότητα DR < 10% στα 10 έτη
Μεσαίος κίνδυνος:	πιθανότητα DR 10 - 20% στα 10 έτη
Υψηλός κίνδυνος:	πιθανότητα DR > 20% στα 10 έτη

Ανάλυση

Παράχθηκαν διαγράμματα Kaplan-Meier για κάθε ομάδα κινδύνου. Πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι αναλογίας πιθανοτήτων (χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της εφαρμογής δύο στατιστικών μοντέλων) για τη δοκιμή Oncotype Dx της Genomic Health (RS, Βαθμολογία υποτροπής) και τη δοκιμή ανοσοϊστοχημείας κύριου ερευνητή (IHC4). Αυτά τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που λήφθηκαν για το ROR έτσι ώστε να καθοριστεί ο βαθμός στον οποίο κάθε σύστημα βαθμολογίας παρέχει πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες πέραν του CTS. Τα αποτελέσματα IHC4 δεν θα συζητηθούν περαιτέρω, καθώς είναι δύσκολο να συγκριθούν με τους άλλους προσδιορισμούς, επειδή η δοκιμή IHC4 πραγματοποιήθηκε με εκπαίδευση βάσει των δεδομένων της μελέτης TransATAC.

Πίνακας 26: Περίληψη δημογραφικών στοιχείων και κλινικών χαρακτηριστικών

Χαρακτηριστικό	Τρέχουσα μελέτη (n = 1.007)		Αρχική μελέτη από την οποία λήφθηκε το RNA (n = 1.231)	Μη συμπερίληψη σκελών ενός παράγοντα ATAC (n = 2.929)
	Αρ. ασθενών	% ασθενών		
Κατάσταση λεμφαδένων				
Αρνητική	701	70%	71%	68%
Θετική	268	27%	25%	25%
Άγνωστη	38	4%	4%	7%
Μέγεθος όγκου				
≤ 1 cm	138	14%	67%	70%
1-2 cm	523	52%		
2-3 cm	253	25%	33%	30%
> 3 cm	93	9%		
Κατάταξη όγκου				
Καλή	213	21%	27%	25%
Μέτρια	601	60%	57%	59%
Κακή	193	19%	16%	17%
Ηλικία				
Μέση	64,4 ετών		64,3	66,1

Πίνακας 27: Πρόσθετα κλινικά χαρακτηριστικά

Χαρακτηριστικό	Αριθμός ασθενών	% ασθενών
Υπότυπος		
Βασικού τύπου	9	1%
HER2-εμπλοτισμένος	41	4%
Αυλικού τύπου A	692	69%
Αυλικού τύπου B	265	26%
Αγωγή		
Αναστροζόλη	513	51%
Ταμοξифαίνη	494	49%
Υποτροπές		
Οποιαδήποτε	210	21%
Μετάσταση	160	16%
Κατάσταση HER2		
Αρνητική	888	88%
Θετική	119	12%

Αποτελέσματα

Ο έλεγχος της κύριας ανάλυσης έδειξε ότι η βαθμολογία ROR παρέχει πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών (CTS). Όλα τα αναφερόμενα δεδομένα ROR που ακολουθούν βασίζονται στα 46 γονίδια, καθώς αυτή είναι η βάση για το ROR που αναφέρεται στον Προσδιορισμό Prosigna.

Πίνακας 28: Έλεγχος κύριας ανάλυσης βαθμολογίας ROR

Μηδενικό μοντέλο	Εναλλακτικό μοντέλο	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 τιμή p
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

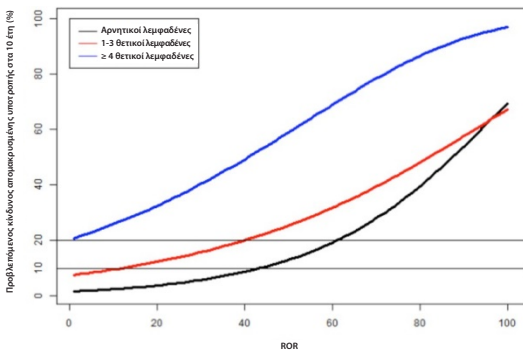
Οι δευτερεύουσες αναλύσεις έδειξαν ότι το ROR σχετίζεται σημαντικά με την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής και προσθέτει διαγνωστικές πληροφορίες πέραν του CTS σε πολλές κλινικά σχετικές υποομάδες.

Πίνακας 29: Επανάληψη ελέγχου κύριας ανάλυσης για προκαθορισμένες υποομάδες

Ομάδα υποκειμένων	Καταληκτικό σημείο	Αρ. ασθενών	Αρ. συμβάντων	CTS+ROR σε σύγκριση με CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 τιμή p
Όλα	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-αρνητικά	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Αρνητικοί λεμφαδένες	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Θετικοί λεμφαδένες	DRFS	268	81	9,3	0,023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2 αρνητικό αρνητικοί λεμφαδένες	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

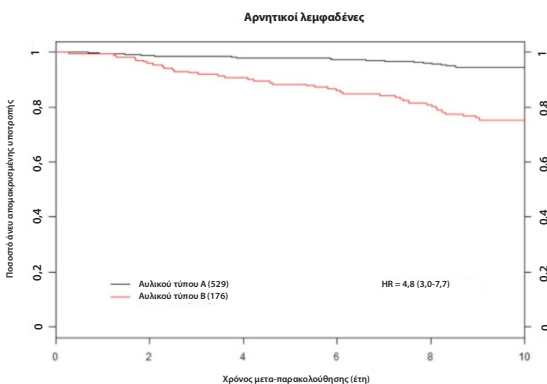
Η κύρια και οι δευτερεύουσες αναλύσεις έδειξαν ότι το ROR σχετιζόταν συνεχώς με το DRFS σε όλες τις ασθενείς και όλες τις υποομάδες.

Εικόνα 22: Προβλεπόμενος κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής στα δέκα έτη εκτιμώμενος με την ανάλυση της βαθμολογίας ROR εντός της ομάδας κατάστασης λεμφαδένων

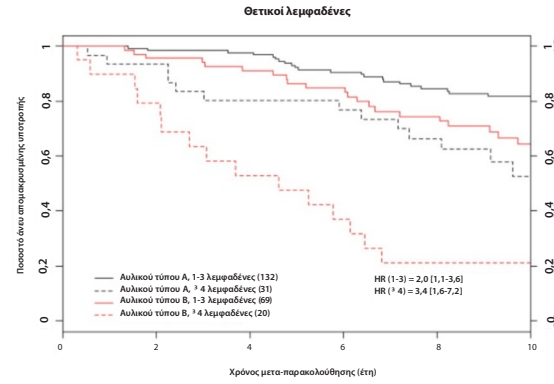


Οι δευτερεύουσες αναλύσεις έδειξαν ότι ο Αυλικός τύπος Α και ο Αυλικός τύπος Β είχαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα εντός κάθε υποομάδας ασθενών ορισμένης με βάση την κατάσταση λεμφαδένων.

Εικόνα 23: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες κατά ενδογενή υπότυπο

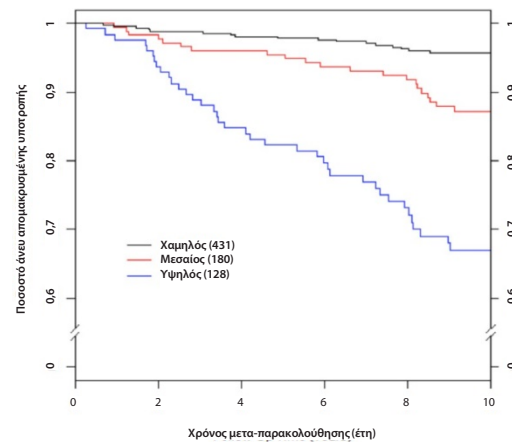


Εικόνα 24: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS για ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες κατά ενδογενή υπότυπο



Οι Εικόνες 25 και 26 δείχνουν ότι εντός κάθε κατηγορίας λεμφαδένων, ο απόλυτος κλινικός κίνδυνος των ασθενών με χαμηλό προβλεπόμενο κίνδυνο ήταν σημαντικά διαφορετικός από τον απόλυτο κλινικό κίνδυνο των ασθενών με υψηλό προβλεπόμενο κίνδυνο: για τις ασθενείς με χαμηλό προβλεπόμενο κίνδυνο παρατηρήθηκαν ποσοστά DR στα 10 έτη μικρότερα από 10%, ενώ για τις ασθενείς με υψηλό προβλεπόμενο κίνδυνο τα ποσοστά DR στα 10 έτη ήταν μεγαλύτερα από 30%.

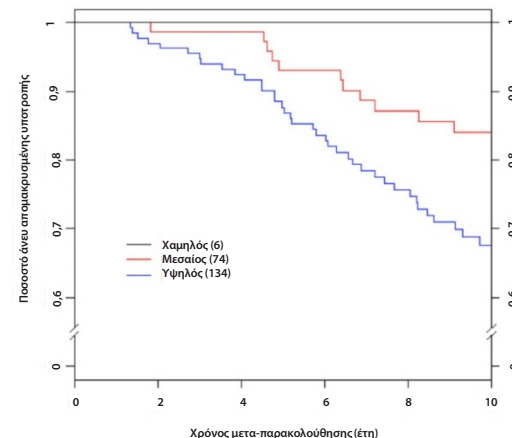
Εικόνα 25: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες εκτός από CTS



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 25: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες εκτός από CTS

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	431 (58%)	17	96% [94% - 98%]
Μεσαίος	180 (24%)	22	86% [81% - 92%]
Υψηλός	128 (17%)	38	67% [59% - 76%]
Συνολικά	739 (100%)	77	

Εικόνα 26: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες χωρίς CTS



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 26: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες χωρίς CTS

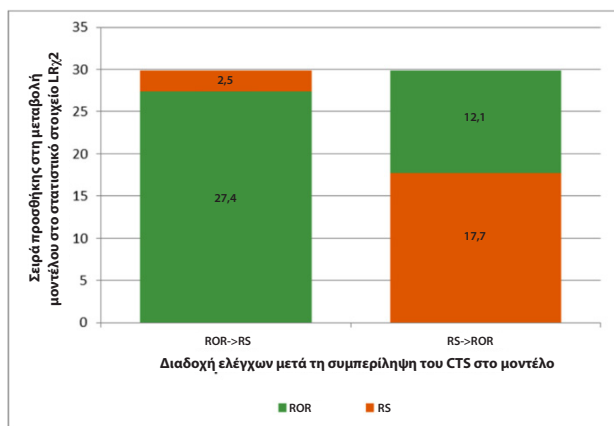
Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	6 (3%)	0	100% [Δ,Υ]
Μεσαίος	74 (35%)	11	84% [76% - 93%]
Υψηλός	134 (63%)	38	68% [59% - 77%]
Συνολικά	214 (100%)	49	

Σύγκριση ROR με RS

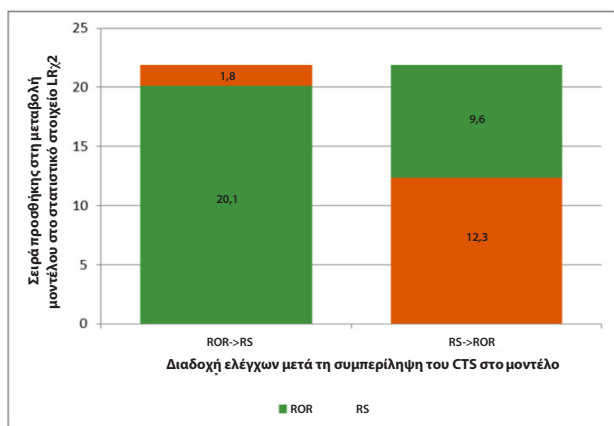
Από τα 1.007 δείγματα με βαθμολογίες ROR, υπήρχαν διαθέσιμα αποτελέσματα από τη δοκιμή Oncotype Dx και για τα 1.007 δείγματα, αλλά αποτελέσματα IHC υπήρχαν διαθέσιμα μόνο για τα 940 δείγματα. Για να είναι δυνατή η σύγκριση και των τριών δοκιμών, τα αποτελέσματα σε αυτήν την ενότητα βασίζονται στα 940 δείγματα που είχαν αποτελέσματα και για τις τρεις μεθόδους (ωστόσο η δοκιμή IHC4 δεν αναφέρεται εδώ). Παρουσιάζονται οι έλεγχοι αναλογίας πιθανοτήτων για την προσθήκη μιας μεταβλητής και για να είναι οι προστιθέμενες πληροφορίες στατιστικά σημαντικές ($\alpha = 0.05$), η μεταβολή του στατιστικού στοιχείου 1 βαθμού ελευθερίας χ^2 πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3,84. Οι παρακάτω εικόνες δείχνουν τις πληροφορίες που προστίθενται, όταν η προγνωστική δοκιμή προστίθεται σε άλλη προγνωστική δοκιμή συν την CTS κατά διαδοχή. Σε κάθε προσθήκη, οι προστιθέμενες πληροφορίες μετρώνται από τη μεταβολή στο χ^2 .

Προσθήκη ROR στο RS συν στο CTS: προγνωστικές πληροφορίες

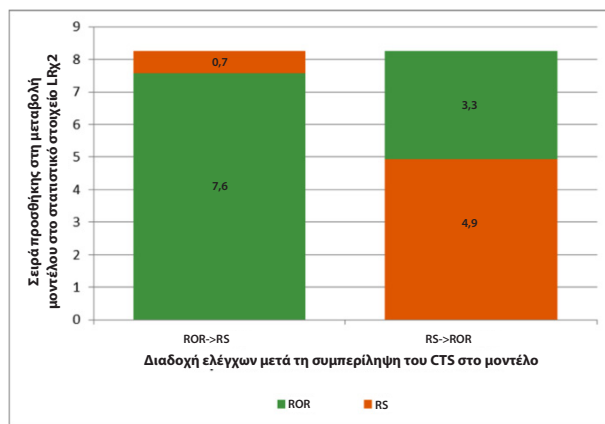
Εικόνα 27: Προγνωστικές πληροφορίες για DRFS πέραν του CTS σε όλες τις ασθενείς (n = 940)



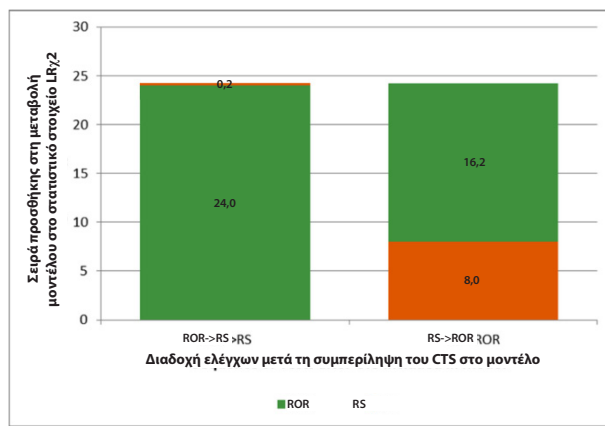
Εικόνα 28: Προγνωστικές πληροφορίες για DRFS πέραν του CTS σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες (n = 683)



Εικόνα 29: Προγνωστικές πληροφορίες για DRFS πέραν του CTS σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (n = 257)



Εικόνα 30: Προγνωστικές πληροφορίες για DRFS πέραν του CTS σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό (n = 649)



Οι Εικόνες 27 έως 30 δείχνουν τις πληροφορίες που προστίθενται πέραν του CTS, όταν προστίθενται διαδοχικά οι δύο προγνωστικές δοκιμές. Σε κάθε προσθήκη, οι προστιθέμενες πληροφορίες μετρώνται από τη μεταβολή στο στατιστικό στοιχείο χ^2 . Για παράδειγμα, όταν το ROR ήταν η πρώτη δοκιμή που προστέθηκε μετά τη συμπερίληψη του CTS (όλα τα δεδομένα ασθενών), η μεταβολή στο στατιστικό στοιχείο χ^2 ήταν 27,4. Με το CTS και το ROR στο μοντέλο, η προσθήκη του RS επέφερε μεταβολή στο στατιστικό στοιχείο χ^2 κατά 2,5, που δεν είναι σημαντική (η κρίσιμη τιμή για τη δοκιμή χ^2 με 1 βαθμό ελευθερίας είναι 3,84), δηλαδή όταν στο μοντέλο περιλαμβάνεται το CTS και το ROR, το RS δεν προσθέτει σημαντικές πληροφορίες. Ωστόσο, εάν το RS είναι η πρώτη δοκιμή που προστίθεται, υπάρχουν ακόμα πληροφορίες στο ROR που δεν περιλαμβάνονται στο συνδυασμό CTS και RS. Και οι δύο δοκιμές παρουσιάζουν προγνωστική σημασία, όταν προστίθενται στο CTS σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες, αλλά καμία από τις δοκιμές δεν παρουσιάζει σημασία ως δεύτερη προστιθέμενη δοκιμή, πιθανά λόγω του μικρότερου μεγέθους δείγματος. Για το υποσύνολο ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό, το RS δεν προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες στο συνδυασμό CTS + ROR. Από την άλλη μεριά, το ROR προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες στο συνδυασμό CTS + RS.

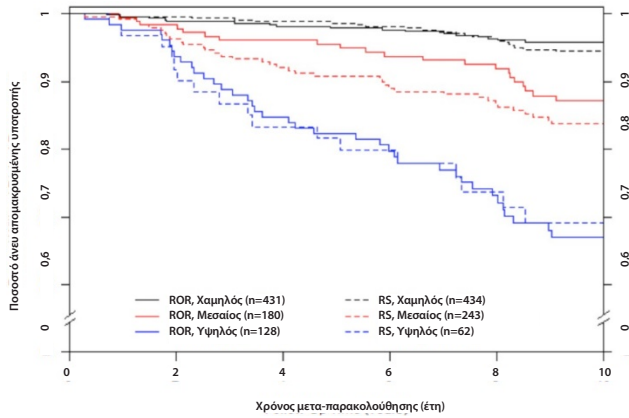
ROR σε σύγκριση με RS: αποτέλεσμα ομάδων κινδύνου

Για να συγκρίνουμε τον τρόπο διαχωρισμού των ασθενών σύμφωνα με τον κίνδυνο στις δύο δοκιμές, οι ομάδες κινδύνου ορίστηκαν βάσει της εκτίμησης του κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη κάθε δοκιμής στον πληθυσμό TransATAC. Για να οριστούν οι ομάδες κινδύνου, επιλέχθηκαν κατώφλια βαθμολογίας κινδύνου για κάθε δοκιμή βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης TransATAC μας, έτσι ώστε να οριστούν ομάδες κινδύνου που περιέχουν ασθενείς με τον ίδιο κίνδυνο. Για να επιτευχθούν αυτές οι συγκρίσιμες ομάδες κινδύνου, τα σημεία αποκοπής που χρησιμοποιήθηκαν για το Oncotype DX ήταν διαφορετικά από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν από την Genomic Health. Για κάθε δοκιμή, η ομάδα χαμηλού κινδύνου ορίστηκε προοπτικά ως ασθενείς με εκτιμώμενο κίνδυνο υποτροπής μικρότερο από 10%. Για κάθε δοκιμή, η ομάδα μεσαίου κινδύνου ορίστηκε προοπτικά ως ασθενείς με εκτιμώμενο κίνδυνο υποτροπής μεταξύ 10% και 20%. Για κάθε δοκιμή, η ομάδα υψηλού κινδύνου ορίστηκε προοπτικά ως ασθενείς με εκτιμώμενο κίνδυνο υποτροπής μεγαλύτερο από 20%. Η παρακάτω εικόνα συνοψίζει τα μεγέθη και τα αποτελέσματα των ομάδων κινδύνου που ορίστηκαν από κάθε δοκιμή.

Η Εικόνα 31 δείχνει το αποτέλεσμα από την εκχώρηση 26% λιγότερων ασθενών στην ομάδα μεσαίου κινδύνου από το Prosigna σε σχέση με το Oncotype DX (180 ασθενείς έναντι 243 ασθενών). Επιπρόσθετα, το Prosigna εκχώρησε περισσότερες ασθενείς στην ομάδα υψηλού κινδύνου από το Oncotype DX. Ωστόσο, οι ομάδες χαμηλού και υψηλού κινδύνου που ορίστηκαν από κάθε δοκιμή έχουν παρόμοια αποτελέσματα, όπως υποδεικνύεται από τις επικαλυπτόμενες καμπύλες Kaplan-Meier. Αυτή η παρατήρηση

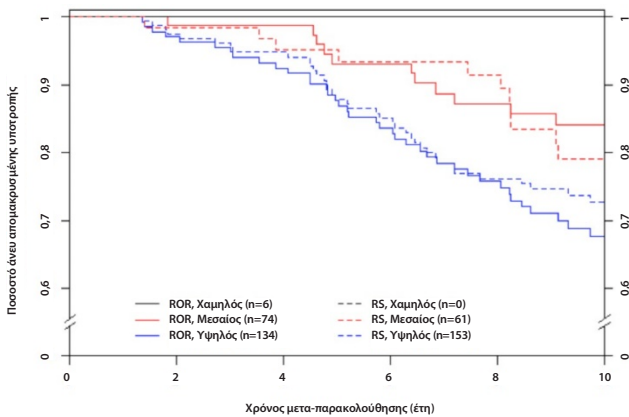
οδήγησε τους ανεξάρτητους ερευνητές της μελέτης TransATAC να συμπεράνουν ότι το Prosigna εκχώρησε λιγότερες ασθενείς στην ομάδα μεσαίου κινδύνου από το Oncotype DX RS, με ισοδύναμο ή μεγαλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων χαμηλού και υψηλού κινδύνου.

Εικόνα 31: Η βαθμολογία ROR του Prosigna προσδιόρισε ουσιαστικά περισσότερες ασθενείς υψηλού κινδύνου και λιγότερες ασθενείς μεσαίου κινδύνου σε σύγκριση με τη βαθμολογία RS του Oncotype DX για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες.



Όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο η βαθμολογία ROR σε ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες, 6 ασθενείς είχαν πρόβλεψη κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής < 10%. Καμία από αυτές τις ασθενείς δεν παρουσίασε συμβάντα κατά την εξέλιξη της μελέτης. Παρατηρήθηκε ένα συμβάν σε αυτές τις ασθενείς στα 7,9 έτη και όλες οι υπόλοιπες ασθενείς δεν παρουσίασαν DR τουλάχιστον στα 9,9 έτη μετα-παρακολούθησης. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες που είχαν προβλεφθεί ως χαμηλού κινδύνου ήταν πράγματι χαμηλού κινδύνου. Δεν χρησιμοποιήθηκαν οι έλεγχοι λογαριθμικών βαθμίδων (log-rank) για τη σύγκριση, καθώς δεν υπήρχε ομάδα χαμηλού κινδύνου για το RS.

Εικόνα 32: Σύγκριση ταξινόμησης ομάδων κινδύνου DRFS στα 10 έτη χωρίς τη χρήση του CTS: Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (1-3 λεμφαδένες) (ROR έναντι RS)



Συμπεράσματα κλινικής μελέτης 1

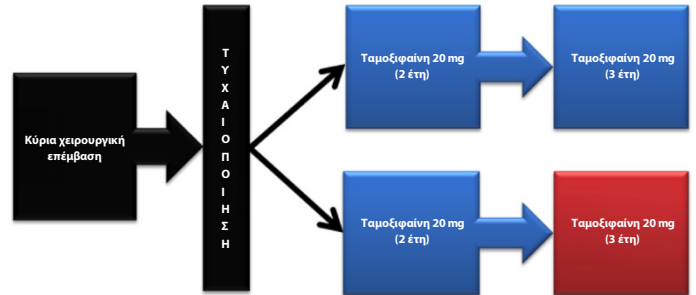
Η κύρια ανάλυση έδειξε ότι το ROR πρόσθεσε σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες πέραν εκείνων των τυπικών κλινικών μεταβλητών (CTS) σε όλες τις ασθενείς και σε όλες τις προκαθορισμένες κλινικά σχετικές υποομάδες. Το ROR αποδείχθηκε ότι υποδιαιρεί τις ασθενείς σε 3 ομάδες κινδύνου, που έχουν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα στις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Οι ενδογενείς υπότυποι Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B αποδείχτηκαν ότι έχουν σημαντικά διαφορετικά DRFS και RFS ανεξάρτητα από την κατάσταση των λεμφαδένων. Σε σύγκριση με τον προγνωστικό δείκτη RS (Βαθμολογία Recurrence Score 21-γονιδίων από Oncotype Dx), το ROR πρόσθεσε προγνωστικές πληροφορίες πέραν του RS σε όλες τις ασθενείς και σε κλινικά σχετικές υποομάδες. Επιπλέον, στην ομάδα αρνητικών λεμφαδένων, το ROR διπλασίασε τον αριθμό ασθενών που εκχωρήθηκαν στην ομάδα μεσαίου κινδύνου και μείωσε σημαντικά τον αριθμό των ασθενών που εκχωρήθηκαν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου, χωρίς να μειώσει τις διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων χαμηλού και υψηλού κινδύνου συγκεριτικά με το RS.

Μελέτη 2: Πρόγνωση για μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με καρκίνο του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα που λάμβαναν μόνο επικουρική συστηματική ενδοκρινική θεραπεία με τη χρήση του Προσδιορισμού Prosigna: μελέτη ABCSG-8

Σχεδίαση μελέτης

Η ομάδα πληθυσμού της μελέτης περιλάμβανε δείγματα ιστού καρκίνου του μαστού FFPE που είχαν συλλεχθεί αναδρομικά και αρχειοθετηθεί στην τράπεζα όγκων ABCSG από ασθενείς που συμμετείχαν στη δοκιμή ABCSG-8 την περίοδο μεταξύ 1996 και 2004¹³. Συνολικά 3.901 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού HR+, πρώιμου σταδίου τυχαιοποιήθηκαν πριν από τη θεραπεία με επικουρική Ταμοξιφαίνη για δύο έτη και στη συνέχεια με Arimidex® (αναastrozόλη) για τρία έτη ή με επικουρική Ταμοξιφαίνη για 5 έτη. Η δομή της θεραπείας που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή απεικονίζεται στην Εικόνα 33.

Εικόνα 33: Σχηματικό διάγραμμα σχεδίασης της μελέτης για τη δοκιμή ABCSG-8



Η ομάδα πληθυσμού επικύρωσης αντιπροσωπεύει το κλάσμα της αξιολογήσιμης ομάδας πληθυσμού της μελέτης ABCSG-8 για την οποία ήταν δυνατή η συλλογή δειγμάτων ιστού από την αναδρομικά αρχειοθετημένη τράπεζα όγκων ABCSG και για την οποία ήταν δυνατή η λήψη συναίνεσης κατά την ενημέρωσης ή η ασθενής είχε αποβιώσει. Ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής για την αρχική δοκιμή εξαιρέθηκαν είτε επειδή ο ιστός δεν ήταν διαθέσιμος για τον προσδιορισμό της NanoString είτε επειδή δεν ήταν δυνατή η λήψη συναίνεσης από την ασθενή ή για κανέναν άλλο λόγο. Όλα τα δείγματα με τεμάχιο όγκου και συναίνεση ασθενούς ελέγχθηκαν ως τμήμα αυτής της μελέτης.

Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε τους ενδογενείς υπότυπους που παράγαγε ο προσδιορισμός και εκτίμησε τη βαθμολογία ROR χρησιμοποιώντας ένα προκαθορισμένο σχέδιο ανάλυσης. Η βαθμολογία ROR, που κυμαίνεται μεταξύ 0-100, υπολογίστηκε με τη χρήση ενός υποσυνόλου 46 γονιδίων από τα 50 γονίδια ελέγχου που είχαν δημοσιευτεί προηγουμένως². Οι συντελεστές για το ROR υπολογίστηκαν από ένα μοντέλο Cox που περιλαμβάνει τον συσχετισμό του Pearson με τα 46 γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό κάθε ενδογενούς υπότυπου, μια βαθμολογία πολλαπλασιασμού και το χονδρικό μέγεθος του όγκου. Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν στα μέγιστα δυνατά δεδομένα μετα-παρακολούθησης.

Το κύριο καταληκτικό σημείο ήταν η επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής (DRFS). Αυτή η παράμετρος ορίστηκε ως το διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την απομακρυσμένη υποτροπή ή το θάνατο λόγω του καρκίνου του μαστού. Το δευτερεύον καταληκτικό σημείο ήταν η επιβίωση άνευ υποτροπής (RFS). Αυτή η παράμετρος ορίστηκε ως το διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την πρώτη υποτροπή (τοπική, περιοχική ή απομακρυσμένη) ή το θάνατο λόγω του καρκίνου του μαστού.

Χρησιμοποιώντας όλα τα διαθέσιμα δείγματα ασθενών, εφαρμόστηκαν πολυμεταβλητά, αναλογικά μοντέλα κινδύνων Cox (PH) για την αξιολόγηση του κύριου στόχου σε διαδοχικούς ελέγχους της βαθμολογίας ROR. Το μοντέλο συμπεριλάμβανε τις τυπικές κλινικές μεταβλητές (ηλικία, ταξινόμηση όγκου, χονδρικό μέγεθος όγκου, κατάσταση λεμφαδένων, επικουρική θεραπεία). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ένα μοντέλο Cox και χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμή αναλογίας πιθανοτήτων για να ελεγχθεί εάν το ROR προσθέτει στατιστικά σημαντικές ($\alpha = 0,05$) πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες πέραν εκείνων που περιλαμβάνονταν στη βαθμολογία Clinical Treatment Score (CTS). Η βαθμολογία CTS είναι ένας βελτιστοποιημένος συνδυασμός κλινικοπαθολογικών παραγόντων που έχει αναπτυχθεί ως μέτρο τυπικής παθολογίας¹². Οι κύριες αναλύσεις επαναλήφθηκαν για διαφορετικά υποσύνολα ασθενών (όλα, αρνητικοί λεμφαδένες, θετικοί λεμφαδένες ή μόνο HER2-αρνητικοί) και καταληκτικά σημεία (DRFS ή RFS).

Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε σειριακή προσέγγιση, στην οποία ο κύριος επιστημονικός στόχος ήταν να αποδειχθεί ότι το ROR προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών. Ο κύριος στόχος πρόσθεσε μια επιπλέον απαίτηση για να αποδειχθεί ότι η κατηγοριακή ταξινόμηση κινδύνου σε μία από τρεις ομάδες (χαμηλό/μεσαίο/υψηλό) προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών. Για την ικανοποίηση αυτής της απαίτησης, έπρεπε να αποδειχθούν οι δύο παρακάτω υποθέσεις:

- Η συνεχής βαθμολογία ROR προσθέτει προγνωστική αξία πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών
- Σε περίπτωση απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης απουσίας προγνωστικών πληροφοριών, οι κατηγορίες κινδύνου βάσει του ROR προσθέτουν προγνωστική αξία πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών

Χρησιμοποιώντας όλα τα διαθέσιμα δείγματα ασθενών, εφαρμόστηκαν πολυμεταβλητά, αναλογικά μοντέλα κινδύνων Cox (PH) για την αξιολόγηση του κύριου στόχου σε διαδοχικούς ελέγχους της βαθμολογίας ROR και κατόπιν προκαθορισμένες κατηγορίες κινδύνου βάσει του ROR. Τα μοντέλα συμπεριλάμβαναν τις ακόλουθες κατηγοριακές, τυπικές κλινικές συμμεταβλητές (με πιθανές τιμές):

- Ηλικία (≥ 65 ή < 65)
- Κατάταξη (G1 ή G2/GX)
- Χονδρικό μέγεθος όγκου (T1, T2/T3)
- Κατάσταση λεμφαδένων (N0, N+(1-3), N+ ≥ 4)
- Επικουρική θεραπεία (μόνο Ταμοξифαίνη ή Ταμοξифαίνη → Αναστροζόλη)

όπου το N0 δηλώνει τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, το N+(1-3) δηλώνει τις ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και το N+ ≥ 4 δηλώνει τις ασθενείς με 4 ή περισσότερους θετικούς λεμφαδένες. Το T1 υποδεικνύει όγκο ≤ 2 cm κατά πλάτος, το T2 υποδεικνύει όγκο μεγαλύτερο από 2 cm αλλά όχι μεγαλύτερο από 5 cm κατά πλάτος και το T3 υποδεικνύει όγκο μεγαλύτερο από 5 cm κατά πλάτος. Στη μελέτη υπήρχαν μόνο 14 δείγματα T3, γι' αυτό συνδυάστηκαν με τα δείγματα T2. Οι ικανοποιητικά διαφοροποιημένοι όγκοι (G1) συγκρίθηκαν με το συνδυασμό μέτρια διαφοροποιημένων (G2) και ενδολοβιακών όγκων GX. Οι ενδολοβιακοί όγκοι GX αντιμετωπίστηκαν ως όγκοι G2 για την ανάλυση, επειδή οι όγκοι G2 είναι η συνηθέστερη κατάταξη στον πληθυσμό ασθενών που προορίζονται για τη συγκεκριμένη χρήση.

Αυτές οι συμμεταβλητές εισάγονται στο μοντέλο με τη μορφή της βαθμολογίας Clinical Treatment Score (CTS). Για να ληφθεί το CTS, εφαρμόστηκε το ακόλουθο μοντέλο:

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

Όπου τα z αντιπροσωπεύουν τις κλινικές μεταβλητές και τις μεταβλητές αγωγής που αναφέρθηκαν παραπάνω και το CTS με τη χρήση των εκτιμήσεων για τα γ που λήφθηκαν παραπάνω, δηλαδή, $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$.

Η υπόθεση αναλογικών κινδύνων ελέγχθηκε με τη χρήση των υπολοίπων Schoenfeld.

Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη επικύρωσης είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα στην αρχική μελέτη ACBSG-8.

Πίνακας 30: Περιλήψη κλινικών χαρακτηριστικών

Χαρακτηριστικό	Τιμή	Συμπεριλαμβανόμενο (n = 1.478)		Μη συμπεριλαμβανόμενο (n = 2.236)		Συνολικά (n = 3.714)	
		Αρ.	%	Αρ.	%	Αρ.	%
Αγωγή	Μόνο ταμοξифαίνη	741	50,1%	1108	49,3%	1.849	49,8%
	Ταμοξифαίνη → Αναστροζόλη	737	49,9%	1128	50,2%	1.865	50,2%
Κατάσταση ER	Αρνητική	14	0,9%	32	1,4%	46	1,2%
	Θετική	1.464	99,1%	2.199	98,3%	3.663	98,6%
	Άγνωστη	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Κατάταξη	G1	271	18,3%	468	20,8%	739	19,9%
	G2	1.152	77,9%	1.659	73,9%	2.811	75,7%
	GX	55	3,7%	109	4,9%	164	4,4%
Κατάσταση λεμφαδένων	N0	1.047	70,8%	1.723	76,7%	2.770	74,6%
	N+(1-3)	382	25,8%	449	20,0%	831	22,4%
	N+ ≥ 4 *	49	3,3%	64	2,8%	113	3,0%
Κατάσταση PgR	Αρνητική	260	17,6%	424	18,9%	684	18,4%
	Θετική	1.218	82,4%	1.805	80,4%	3.023	81,4%
	Άγνωστη	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
Στάδιο όγκου	T1	1.037	70,2%	1.745	77,7%	2.782	74,9%
	T2	427	28,9%	472	21,0%	899	24,2%
	T3	14	0,9%	19	0,8%	33	0,9%
Ηλικία	Μέση	63		$\Delta\gamma$		64	
	Εύρος	41-79				41-80	

* Περιλαμβάνεται μία ασθενής με > 9 θετικούς λεμφαδένες

Πίνακας 31: Πρόσθετα κλινικά χαρακτηριστικά

Χαρακτηριστικό	Τιμή	Αριθμός ασθενών	% ασθενών
Ενδογενής υπότυπος NanoString	Αυλικού τύπου A	1.004	67,9%
	Αυλικού τύπου B	418	28,3%
	HER2-εμπλουτισμένος	48	3,2%
Υποτροπές	Βασικού τύπου	8	0,5%
	Μετάσταση	155	10,5%
Κατάσταση HER2	Οποιαδήποτε	194	13,1%
	Αρνητική	1.397	94,5%
	Θετική	77	5,2%
	Άγνωστη	4	0,3%

Αποτελέσματα

Από τους 1.620 ιστούς που ήταν διαθέσιμοι για έλεγχο, οι 25 (1,5%) δεν πέρασαν την προκαθορισμένη παθολογοανατομική ανασκόπηση επαρκούς όγκου, τα 73 από τα 1.595 δείγματα ασθενών (4,6%) με βιώσιμο διηθητικό ιστό δεν πέρασαν τις προκαθορισμένες προδιαγραφές QC για το εξαγμένο RNA και τα 44 από τα 1.522 δείγματα RNA (2,9%) είχαν αποτυχία ως προς τις προδιαγραφές QC του προσδιορισμού για τα αποτελέσματα του Prosigna, αφήνοντας συνολικά 1.478 διαθέσιμα δείγματα (91,2%) για την ανάλυση.

Από τις 1.478 ασθενείς που ήταν διαθέσιμες για ανάλυση, οι 155 είχαν μεταστάσεις και οι 194 είχαν τοπική ή απομακρυσμένη υποτροπή ή θάνατο λόγω του καρκίνου του μαστού. Η μέση περίοδος μετα-παρακολούθησης για τη δοκιμή ήταν 10 έτη.

Ο έλεγχος της κύριας ανάλυσης έδειξε ότι η βαθμολογία ROR παρέχει σημαντικές πρόσθετες προγνωστικές πληροφορίες για την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών (CTS).

Πίνακας 32: Περιλήψη του ελέγχου κύριας ανάλυσης

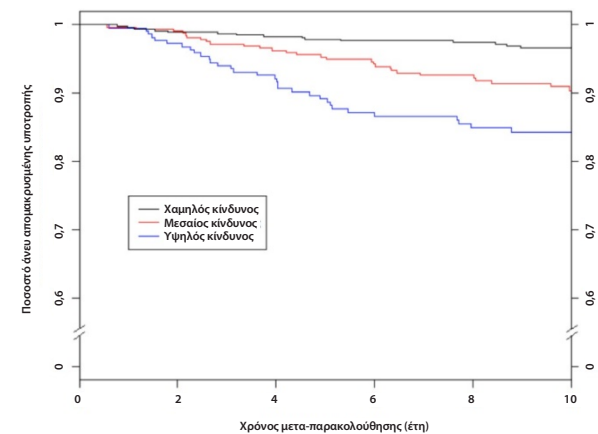
Μηδενικό μοντέλο	Εναλλακτικό μοντέλο	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 Κρίσιμη τιμή (Βαθμοί ελευθερίας)	χ^2 τιμή p
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Ομάδα κινδύνου	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Οι δευτερεύουσες αναλύσεις έδειξαν ότι το ROR σχετίζεται σημαντικά με την επιβίωση άνευ απομακρυσμένης υποτροπής και προσθέτει διαγνωστικές πληροφορίες πέραν του CTS σε πολλές κλινικά σχετικές υποομάδες.

Πίνακας 33: Επανάληψη ελέγχου κύριας ανάλυσης για προκαθορισμένες υποομάδες

Ομάδα υποκειμένων	Αρ. ασθενών	Αρ. συμβάντων	CTS+ROR σε σύγκριση με CTS	CTS+Ομάδα κινδύνου σε σύγκριση με CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (Κρίσιμ. τιμή = 3,84)	$\Delta LR \chi^2$ (Κρίσιμ. τιμή = 5,99)
Όλα	1.478	155	53,49	34,12
HER2-αρνητικό	1.397	145	47,50	29,94
N0	1.047	86	25,57	23,36
N0, HER2-αρνητικό	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-αρνητικό	367	56	22,75	18,75

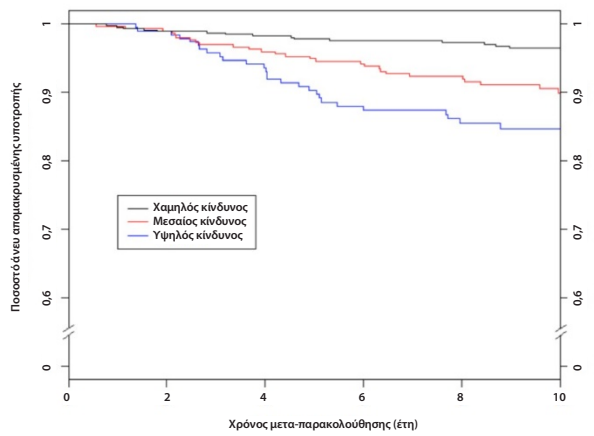
Εικόνα 34: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



Περιλήψη δεδομένων για την Εικόνα 34: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	487 (47%)	15	96,6% [94,4% - 97,9%]
Μεσαίος	335 (32%)	28	90,4% [86,3% - 93,3%]
Υψηλός	225 (21%)	32	84,3% [78,4% - 88,6%]
Συνολικά	1.047 (100%)	75	

Εικόνα 35: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό

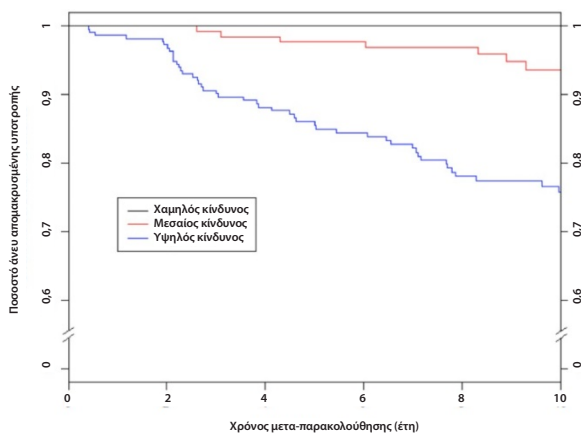


Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 35: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	474 (48%)	15	96,5% [94,3% - 97,9%]
Μεσαίος	311 (32%)	27	90% [85,6% - 93,1%]
Υψηλός	199 (20%)	27	84,7% [78,4% - 89,3%]
Συνολικά	984 (100%)	69	

Η Εικόνα 36 δείχνει τα διαγράμματα Kaplan-Meier κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και η Εικόνα 37 δείχνει τα ίδια διαγράμματα για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό. Τα αποτελέσματα με και χωρίς τις ασθενείς με HER2-θετικό είναι παρόμοια.

Εικόνα 36: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

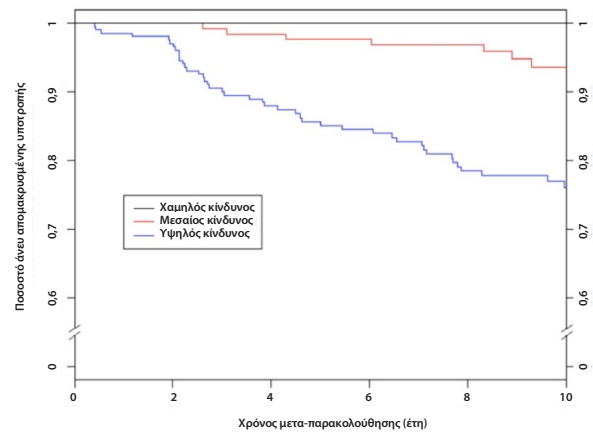


Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 36: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Μεσαίος	143 (37%)	7	93,6% [86,9% - 97%]
Υψηλός	224 (59%)	46	75,8% [68,9% - 81,4%]
Συνολικά	382 (100%)	53	

* Διάστημα εμπιστοσύνης εκτιμώμενο με τη μέθοδο Clopper-Pearson

Εικόνα 37: DRFS κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό



Περίληψη δεδομένων για το DRFS της Εικόνας 37 κατά ομάδα κινδύνου για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και HER2-αρνητικό

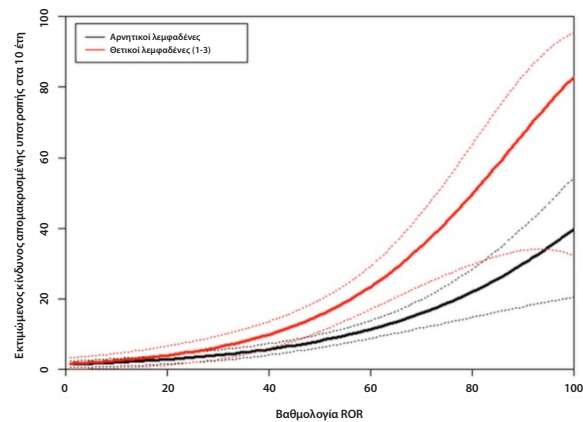
Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Χαμηλός	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Μεσαίος	142 (39%)	7	93,6% [86,8% - 96,9%]
Υψηλός	210 (57%)	43	76,1% [69,0% - 81,8%]
Συνολικά	367 (100%)	50	

* Διάστημα εμπιστοσύνης εκτιμώμενο με τη μέθοδο Clopper-Pearson.

Σχέση μεταξύ ROR και πρόγνωσης κινδύνου

Η Εικόνα 38 δείχνει τον κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη συναρτήσει της βαθμολογίας ROR με διαστήματα εμπιστοσύνης 95% βάσει ξεχωριστών αναλογιών προς Cox μοντέλων κινδύνου για κάθε ομάδα ασθενών με αρνητικούς και θετικούς (1-3) λεμφαδένες. Για τις ασθενείς με θετικούς (1-3) λεμφαδένες, η υπόθεση αναλογικών κινδύνων παραβιάστηκε κατά την εφαρμογή σε όλο το εύρος. Η καμπύλη που παρουσιάζεται εδώ για τις ασθενείς με θετικούς (1-3) λεμφαδένες χρησιμοποιεί ασθενείς με θετικούς (1-3) λεμφαδένες με βαθμολογίες ROR στο εύρος 0-80, για το οποίο ικανοποιήθηκε η υπόθεση αναλογικών κινδύνων.

Εικόνα 38: Εκτιμώμενος κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη κατά κατηγορία λεμφαδένων με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%



Σε κάθε υποομάδα, απόλυτος κλινικός κίνδυνος των ασθενών που είχαν εκχωρηθεί στην κατηγορία χαμηλού κινδύνου ήταν ουσιαστικά διαφορετικός από τον απόλυτο κλινικό κίνδυνο των ασθενών που είχαν εκχωρηθεί στην κατηγορία υψηλού κινδύνου.

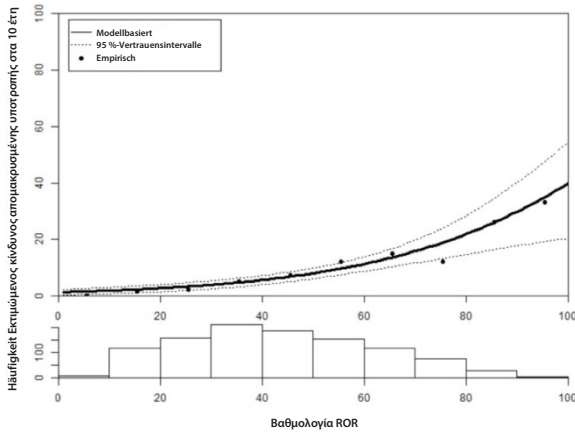
Ο Πίνακας 34 δείχνει την κατανομή των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες κατά περιοχές 10 μονάδων ROR. Επίσης υποδεικνύεται ο κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη.

Πίνακας 34: Κατανομή ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες κατά εύρος 10 μονάδων ROR

Εύρος ROR	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό ασθενών	Κίνδυνος DR στα 10 έτη (Εμπειρικός)
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%
Συνολικά	1,047	100%	

Η Εικόνα 39 δείχνει την καμπύλη βάσει μοντέλου για τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες μαζί με τα εκτιμώμενα ποσοστά επιβίωσης στα 10 έτη για τις 10 περιοχές, όπου κάθε περιοχή αποτελείται από όλες τις ασθενείς εντός του εύρους 10 μονάδων ROR (1-10, 11-20 κ.λπ.). Κάτω από την καμπύλη δίνεται ένα ιστόγραμμα που υποδεικνύει την κατανομή συχνότητας κατά περιοχή.

Εικόνα 39: Σύγκριση εκτιμήσεων βάσει μοντέλου και εμπειρικών εκτιμήσεων του κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες με την κατανομή βαθμολογιών ROR που δίνεται παρακάτω



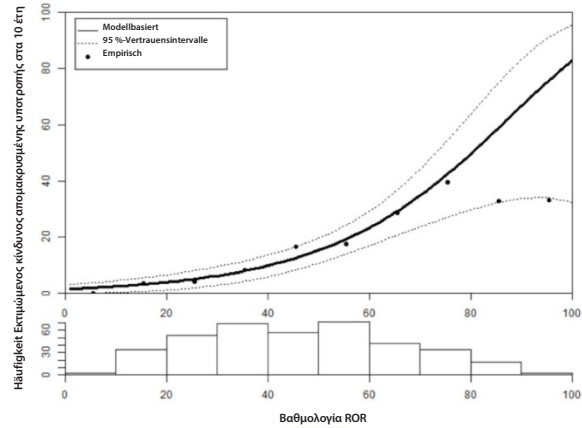
Για τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, οι εκτιμήσεις βάσει του μοντέλου αναλογικών κινδύνων ήταν παρόμοιες με τις εμπειρικές εκτιμήσεις σε όλο το εύρος. Ο Πίνακας 35 δείχνει την κατανομή των ασθενών με 1-3 θετικούς λεμφαδένες κατά περιοχές 10 μονάδων ROR. Επίσης υποδεικνύεται ο κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη.

Πίνακας 35: Κατανομή ασθενών με 1-3 θετικούς λεμφαδένες κατά το εύρος 10 μονάδων ROR

Εύρος ROR	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό ασθενών	Κίνδυνος DR στα 10 έτη (Εμπειρικός)
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%
Συνολικά	382	100%	

Η Εικόνα 40 δείχνει την καμπύλη βάσει μοντέλου (χρησιμοποιώντας ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες και βαθμολογίες ROR ≤ 80) για τις ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες μαζί με τα εμπειρικά εκτιμώμενα ποσοστά επιβίωσης στα 10 έτη για τις 10 περιοχές, όπου κάθε περιοχή αποτελείται από όλες τις ασθενείς εντός του εύρους 10 μονάδων ROR (1-10, 11-20 κ.λπ.). Κάτω από την καμπύλη δίνεται ένα ιστόγραμμα που υποδεικνύει την κατανομή συχνότητας κατά περιοχή.

Εικόνα 40: Σύγκριση εκτιμήσεων βάσει μοντέλου και εμπειρικών εκτιμήσεων του κινδύνου απομακρυσμένης υποτροπής στα 10 έτη για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες με την κατανομή βαθμολογιών ROR που δίνεται παρακάτω.



Τόσο ο Πίνακας 35 όσο και η Εικόνα 40 δείχνουν την επιπεδοποίηση του παρατηρούμενου κινδύνου στα 10 έτη στην κορυφή του εύρους ROR που οδήγησε στην αποτυχία της υπόθεσης αναλογικών κινδύνων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα μεγέθη δείγματος στις δύο περιοχές άνω του 80 ήταν μικρά για τις ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες (17 ασθενείς από 81-90 και μόνο 3 από 91-100).

Σύγκριση ενδογενών υποτύπων Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B

Η πλειοψηφία των υποκειμένων στη μελέτη (96%) ήταν είτε Αυλικού τύπου A είτε Αυλικού τύπου B, που ήταν αναμενόμενο, καθώς αυτοί οι ενδογενείς υπότυποι κυριαρχούν στις ασθενείς θετικού ορμονικού υποδοχέα¹².

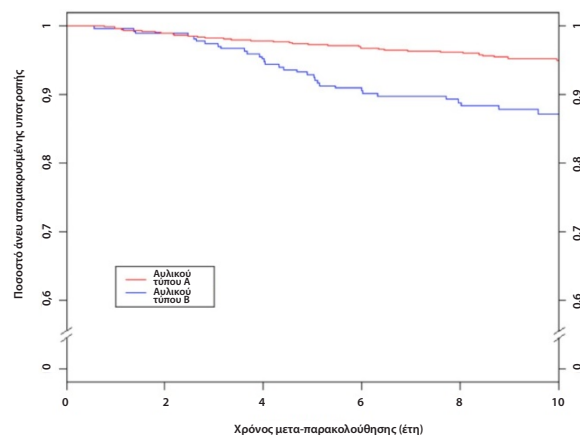
Ο Πίνακας 36 δείχνει τα αποτελέσματα του ελέγχου αναλογίας πιθανοτήτων, έτσι ώστε να καταδείξει την πρόσθετη προγνωστική αξία για το DRFS, καθώς η διάκριση Αυλικού τύπου A/Αυλικού τύπου B προσθέτει πληροφορίες πέραν του CTS. Ο πίνακας δείχνει επίσης την αναλογία κινδύνου των ασθενών Αυλικού τύπου A προς τις ασθενείς Αυλικού τύπου B. Και στις τρεις ομάδες παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερος κίνδυνος απομακρυσμένης υποτροπής για τις ασθενείς Αυλικού τύπου A.

Πίνακας 36: Έλεγχος αναλογίας πιθανοτήτων για την προγνωστική αξία του DRFS των Αυλικών υποτύπων

Υπομάδα	Αρ. ασθενών	Αρ. συμβάντων	ΔLR χ ²	χ ² τιμή p	Αναλογία κινδύνων LumA: LumB (95% CI)
Όλα	1.422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30 – 0,59]
N0	1.009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30 – 0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19 – 0,58]

Η Εικόνα 41 δείχνει μια σύγκριση του DRFS κατά Αυλικό υπότυπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και η Εικόνα 42 δείχνει την ίδια σύγκριση για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες. Και για τις δύο ομάδες, υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του DRFS των ασθενών Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B.

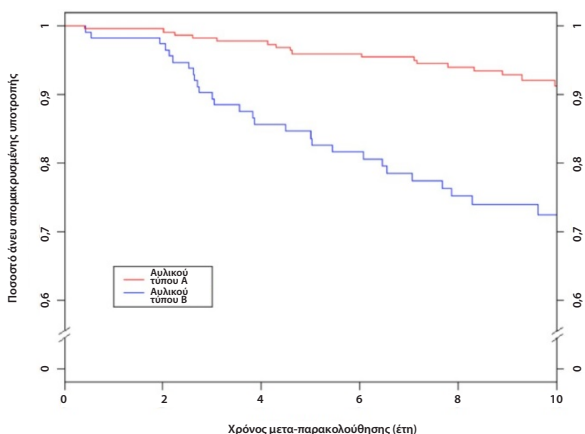
Εικόνα 41: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 41: Καμπύλες Kaplan-Meier για το DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Αυλικού τύπου A	725	32	95,1% [93,4% - 96,3%]
Αυλικού τύπου B	284	32	87,2% [83,2% - 90,3%]
Συνολικά	1.009	64	

Εικόνα 42: Καμπύλες Kaplan-Meier για DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες



Περίληψη δεδομένων για την Εικόνα 42: Καμπύλες Kaplan-Meier για DRFS κατά ενδογενή υπότυπο για ασθενείς με 1-3 θετικούς λεμφαδένες

Ομάδα κινδύνου	Αριθμός ασθενών	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
Αυλικού τύπου A	248	17	91,3% [87,2% - 94,2%]
Αυλικού τύπου B	118	28	72,5% [64,2% - 79,1%]
Συνολικά	366	45	

Ο Πίνακας 37 δείχνει έναν πίνακα των ποσοστών RFS στα 10 έτη κατά αυλικό υπότυπο για τις ομάδες αρνητικών λεμφαδένων και 1-3 θετικών λεμφαδένων.

Πίνακας 37: Ποσοστά RFS στα δέκα έτη κατά ομάδα λεμφαδένων και αυλικό υπότυπο

Κατάσταση λεμφαδένων	Αυλικός υπότυπος	Αριθμός ασθενών (%)	Αριθμός συμβάντων στα 10 έτη	Εκτιμώμενο ποσοστό χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή στα 10 έτη [95% CI]
N0	Αυλικού τύπου A	725 (72)	44	93,0% [91,1% - 94,5%]
	Αυλικού τύπου B	284 (28)	44	82,2% [77,6% - 85,9%]
N+(1-3)	Αυλικού τύπου A	248 (68)	21	89,1% [84,7% - 92,4%]
	Αυλικού τύπου B	118 (32)	30	71,6% [62,2% - 77,4%]

Για κάθε πληθυσμό ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες και 1-3 θετικούς λεμφαδένες, η διαφορά μεταξύ ασθενών Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B ήταν σημαντική.

Συμπεράσματα κλινικής μελέτης 2

Το ROR αποδείχθηκε ότι προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών και μεταβλητών αγωγής, τόσο όταν συμπεριλαμβάνεται ως συνεχής μέτρηση όσο και όταν συμπεριλαμβάνεται στη χρήση τριών προκαθορισμένων ομάδων κινδύνου. Η ομάδα χαμηλού κινδύνου είχε DRFS στα 10 έτη πολύ πάνω από 90% όπως αναμενόταν. Η ομάδα υψηλού κινδύνου είχε DRFS στα 10 έτη 80% που ήταν υψηλότερο από τον αναμενόμενο – αναμενόμενος να είναι φανερά κάτω από 80%. Οι τιμές αποκοπής που χρησιμοποιήθηκαν για τον ορισμό των ομάδων κινδύνου βασίστηκαν στην ομάδα πληθυσμού TransATAC, που είναι υψηλότερου κινδύνου από την τρέχουσα ομάδα πληθυσμού, με αποτέλεσμα η «ομάδα υψηλού κινδύνου» να έχει συνολικά χαμηλότερο κίνδυνο από τον αναμενόμενο. Το ROR (συνεχές και βάσει ομάδας κινδύνου) παρουσίασε παρόμοιες προγνωστικές πληροφορίες σε διάφορες υποομάδες. Το μοντέλο συνεχούς κινδύνου ταιριάζει πολύ με τα εμπειρικά ποσοστά υποτροπής σε πληθυσμούς ασθενών με αρνητικούς και 1-3 θετικούς λεμφαδένες. Η πλειοψηφία των ασθενών (96%) στη μελέτη είχε όγκους αυλικού υποτύπου (Αυλικού τύπου A ή Αυλικού τύπου B). Σε όλες τις ομάδες κατάστασης λεμφαδένων, η διάκριση Αυλικού τύπου A /Αυλικού τύπου B πρόσθεσε προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με το DRFS.

Περίληψη συνδυαστικών κλινικών μελετών

Τα αποτελέσματα είναι γενικεύσιμα για κατανεμημένη χρήση, καθώς τα δείγματα απεστάλησαν και αναλύθηκαν σε διαφορετικά εργαστήρια στις δύο κλινικές μελέτες επικύρωσης. Το ROR αποδείχθηκε ότι προσθέτει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες για το DRFS στα 10 έτη πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών και μεταβλητών αγωγής, τόσο όταν συμπεριλαμβάνεται ως συνεχής μέτρηση όσο και όταν συμπεριλαμβάνεται στη χρήση τριών προκαθορισμένων ομάδων κινδύνου. Επιπρόσθετα, σε μια εκ των υστέρων ανάλυση, το ROR πρόσθεσε σημαντικές πληροφορίες για το DRFS μετά τα 5 έτη πέραν των τυπικών κλινικών μεταβλητών για όλες τις ασθενείς. Το ROR (συνεχές και βάσει ομάδας κινδύνου) παρουσίασε παρόμοιες προγνωστικές πληροφορίες σε διάφορες υποομάδες. Επίσης πραγματοποιήθηκαν περιορισμένες αναλύσεις με τη χρήση του RFS. Οι κλάσεις ROR μπόρεσαν επίσης να ορίσουν τρεις ομάδες κινδύνου με διακριτό RFS. Και για τις δύο ομάδες, υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του DRFS των υποομάδων Αυλικού τύπου A και Αυλικού τύπου B, ανεξάρτητα από την κατάσταση λεμφαδένων.

17 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- (a) Jakesz R, Jonat W, Gnani 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, Gnani 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) Gnani 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 ΣΥΜΒΟΛΑ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

 - Κατασκευαστής

 - Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

 - *In vitro* διαγνωστική ιατρική συσκευή

 - Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες χρήσης

 - Σήμα CE

 - Κωδικός / Αριθμός παρτίδας

 - Αριθμός καταλόγου ή αναφοράς

 - Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> δοκιμασίες

 - Εύρος θερμοκρασίας σε συνθήκες φύλαξης

 - Κάτω όριο θερμοκρασίας σε συνθήκες φύλαξης

 - Άνω όριο θερμοκρασίας σε συνθήκες φύλαξης

 - Ανάλυση έως

 - Αυτή η πλευρά προς τα πάνω

Room Temp. = Θερμοκρασία δωματίου

HYB = Υβριδοποίηση

Αποποίηση ευθύνης σύμφωνα με τους κανονισμούς

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

© 2023 Veracyte, Inc. και θυγατρικές εταιρείες. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Το Veracyte, το λογότυπο Veracyte, το Prosigna και το λογότυπο Prosigna είναι εμπορικά σήματα της Veracyte, Inc. και των θυγατρικών της. Το nCounter είναι εμπορικό σήμα της NanoString Technologies, Inc. και χρησιμοποιείται κατόπιν αδείας.

19 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

 Πληροφορίες επικοινωνίας στις Η.Π.Α.:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Τηλέφωνο : +1-650-243-6335
www.veracyte.com

 Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ε.Ε.:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Πληροφορίες διεθνούς επικοινωνίας:
Email για τεχνική υποστήριξη: DxSupport@Veracyte.com
Email για πληροφορίες σχετικές με το προϊόν: info@prosigna.com
Ιστότοπος: www.prosigna.com