



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº 6 2 9 3

BUENOS AIRES, 15 JUN 2016

VISTO el expediente Nº 1-47-3110-650/16-8 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso “in vitro” denominados 1) SISTEMA DE ANÁLISIS nCounter® Dx/ SISTEMA CONFIGURADO ESPECIFICAMENTE PARA SU USO CON LOS KITS DE PRUEBAS nCounter®; 2) PROSIGNA BREAST CANCER PROGNOSTIC GENE SIGNATURE ASSAY/ ENSAYO QUE UTILIZA EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS ENCONTRADAS EN TEJIDO CON CÁNCER DE MAMA, FIJADO EN FORMALDEHÍDO Y EMBEBIDO EN PARAFINA (FFPE), PARA EVALUAR EL RIESGO DE RECURRENCIA A DISTANCIA EN UN PACIENTE .

Que a fojas 419 a 420 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley Nº 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición ANMAT Nº 2674/99.

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten mark]*



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 6293

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 el por el Decreto N° 101/15 de fecha 16 de diciembre de 2015.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos de los productos de diagnóstico para uso in Vitro denominados 1) SISTEMA DE ANÁLISIS nCounter® Dx/ SISTEMA CONFIGURADO ESPECIFICAMENTE PARA SU USO CON LOS KITS DE PRUEBAS nCounter®; 2) PROSIGNA BREAST CANCER PROGNOSTIC GENE SIGNATURE ASSAY/ ENSAYO QUE UTILIZA EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS ENCONTRADAS EN TEJIDO CON CÁNCER DE MAMA, FIJADO EN FORMALDEHÍDO Y EMBEBIDO EN PARAFINA (FFPE), PARA EVALUAR EL RIESGO DE RECURRENCIA A DISTANCIA EN UN PACIENTE cuya presentación se detalla en el Anexo, con una vida útil de 1) No aplica; 2) 8 (OCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado: A) -20 °C, B) - 80 °C, C) entre 2 y 8 °C y D) entre 15 y 25 °C ; el que será elaborado por NANOSTRING TECHNOLOGIES, Inc. 530 Fairview Ave. N, Suite 2000, Seattle, WA 98109. (USA) e importado terminado por la firma BIOSYSTEMS S.A. y que la composición se detalla a fojas 09.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N.M.A.T

DISPOSICIÓN Nº **6 2 9 3**

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 45 a 365 y 407 a 418. Desglosándose fojas 69 a 175, 409 a 410 y 415 a 416 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

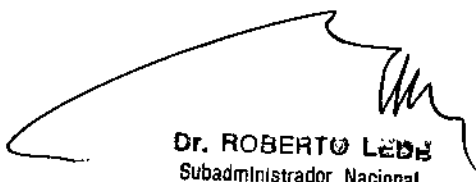
ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE Nº 1-47-3110-650/16-8

DISPOSICIÓN Nº: **6 2 9 3**

Fd

  
Dr. ROBERTO LEDESMA  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

ANEXO

Expediente N° 1-47-3110-650/16-8

**PRODUCTO/USO:** 1) SISTEMA DE ANÁLISIS nCounter® Dx/ SISTEMA CONFIGURADO ESPECIFICAMENTE PARA SU USO CON LOS KITS DE PRUEBAS nCounter®; 2) PROSIGNA BREAST CANCER PROGNOSTIC GENE SIGNATURE ASSAY/ ENSAYO QUE UTILIZA EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS ENCONTRADAS EN TEJIDO CON CÁNCER DE MAMA, FIJADO EN FORMALDEHÍDO Y EMBEBIDO EN PARAFINA (FFPE), PARA EVALUAR EL RIESGO DE RECURRENCIA A DISTANCIA EN UN PACIENTE.

**PRESENTACIÓN:** 1) CONFORMADO POR nCounter® PREP STATION 5S Y nCounter® DIGITAL ANALYZER 5S; 2) ENVASES POR 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30 O 40 DETERMINACIONES, CONTENIEDO:

N° de determinaciones	1	2	3	4	10	20	30	40	
A) 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	2 x 65 µl	3 x 65 µl	4 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	2 x 70 µl	3 x 70 µl	4 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	2 x 30 µl	3 x 30 µl	4 x 30 µl	
CodeSet Barcode Sticker	1	1	1	1	1	2	3	4	
Test Configuration Code	1	1	1	1	1	2	3	4	
B) Prosigna Prep Plate Box									



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

Prep plates	1	1	1	1	2	4	6	8
C) Prosigna Cartridge Box								
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1	2	3	4
D) Prosigna Prep Pack Box								
nCounter Prep Station	1	1	1	1	1	2	3	4
Tips								
nCounter Cartridge	2	2	2	2	2	4	6	8
Adhesive Cover								
nCounter Tip	2	2	2	2	2	4	6	8
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	2 x 580 µl	3 x 580 µl	4 x 580 µl
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4	8	12	16
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4	8	12	16

DISPOSICION N°

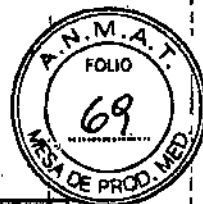
**6 2 9 3**

fd

Dr. ROBERTO VEDE  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.

6293

15 JUN 2016



	Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar	
--	---	--

**PROYECTOS DE ROTULO**

Nombre del producto:

- ✓ Prosigna®
- ✓ nCounter compuesto por:
  - nCounter Prep Station
  - nCounter Digital Analyzer

Nombre del establecimiento elaborador:

**NanoString Technologies, Inc.**  
530 Fairview Ave. N, Suite 2000  
Seattle, WA 98109 Estados Unidos

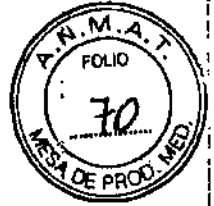
Nombre del establecimiento importador:

**Biosystems S.A.**  
Av. Dorrego 673  
CKB1414- Buenos Aires  
Argentina

Dra. SILVIA ZANELLA  
DIRECTORA TECNICA  
M.N. 121  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Autorizado  
Biosystems S.A.

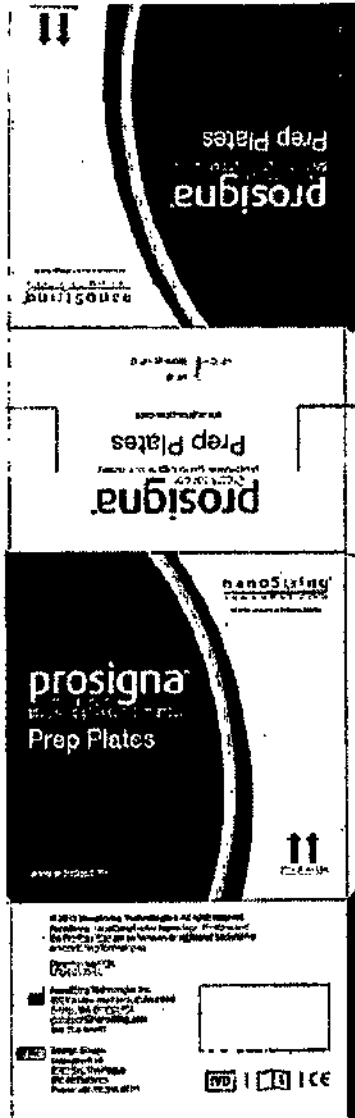
6293



**Prosigna®**

**Prosigna Prep Plates**

➤ **PROYECTO DE ROTULO EXTERNO**



*[Handwritten signature]*

Dra. SILVINA LAVIELLA  
DIRECTORA TECNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandra Diez  
Apoderada  
BioSystems S.A.

*[Handwritten signature]*

6293



Rótulo ampliado

**prosigna**  
Breast Cancer

patented technology for breast cancer diagnosis


**Prep Plates**

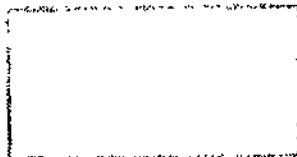
www.prosigna.com




© 2010 Mendocino Technologies. All rights reserved.  
Manufacturing, Marketing, Distribution, and Sales of Prosigna and the Prosigna logo are trademarks or registered trademarks of Mendocino Technologies.

Printed in the USA  
L.A. 201170-02

 Mendocino Technologies Inc.  
620 Parkway Park North, Suite 2000  
South, TX 75088 USA  
info@prosigna.com  
800-426-4940



 Dorrego Dorrego  
Industrial 10  
B-1000, The Village  
The Netherlands  
Phone: +31 706462000



Importado por:  
BioSystems S.A  
Av. Dorrego 673 (C1414CKB)  
TEL: (54-11) 4854-7775  
Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
Uso Profesional Exclusivo

*P*

Prosigna CodeSet

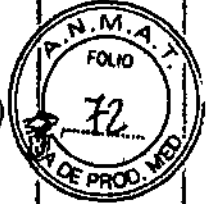
► PROYECTO DE ROTULO EXTERNO

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Prez  
BIO SYSTEMS S.A.



629



prosigna  
Droga de diagnóstico genético  
CodeSet  
www.prosigna.com



© 2010 NanoString Technologies. All rights reserved.  
No garantía, representación o licencia se otorga por el uso de Prosigna como un instrumento de diagnóstico.  
El uso de Prosigna en la UE está autorizado por el Reglamento (CE) 1373/2007.  
Prosigna es un producto de NanoString Technologies Inc.  
18001 Park  
Nashua, NH 03801 USA  
NanoString Technologies Inc.  
5350 Foothill Blvd, Suite 100  
Palo Alto, CA 94303 USA  
distribuidor autorizado  
Biosystems S.A.  
Europa Europa  
Léopold 15  
2010 Blvd. Du Roi  
Bruxelles, Bélgica  
Phone: +32 2 735 5500

www.prosigna.com  
CodeSet  
Droga de diagnóstico genético  
prosigna

www.nanostring.com  
nanoString

Store at -80°C  
or below

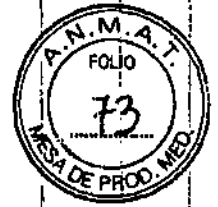
prosigna  
Droga de diagnóstico genético  
CodeSet

www.nanostring.com  
nanoString

Handwritten mark.

Dra. SILVINA VANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
M.I. 14421  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Aslan Dipe  
Biosystems S.A.



6293

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)  
 TEL: (54-11)4854-7775  
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
 Uso Profesional Exclusivo

➤ PROYECTO DE ROTULOS INTERNOS

**Contents**  
 Prosigna Reporter CodeSet, 1 x 65 uL  
 Prosigna Capture ProbeSet, 1 x 70 uL  
 Prosigna RNA Reference Sample, 1 x 30 uL  
 CodeSet Barcode Sticker, 1 each  
 UEL-C0100-01

**Contents**  
 Prosigna Reporter CodeSet, 2 x 65 uL  
 Prosigna Capture ProbeSet, 2 x 70 uL  
 Prosigna RNA Reference Sample, 2 x 30 uL  
 CodeSet Barcode Sticker, 2 each  
 UEL-C0100-01

**Contents**  
 Prosigna Reporter CodeSet, 3 x 65 uL  
 Prosigna Capture ProbeSet, 3 x 70 uL  
 Prosigna RNA Reference Sample, 3 x 30 uL  
 CodeSet Barcode Sticker, 3 each  
 UEL-C0201-01

**Contents**  
 Prosigna Reporter CodeSet, 4 x 65 uL  
 Prosigna Capture ProbeSet, 4 x 70 uL  
 Prosigna RNA Reference Sample, 4 x 30 uL  
 CodeSet Barcode Sticker, 4 each  
 UEL-C0202-01

10

Dra. SILVINA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MN 14421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Pérez  
 Responsable  
 BioSystems S.A.

8293



LOT BRS-001 2013-04  
**PROSIGNA RNA**  
Reference Sample  
NanoString  
30 µl -80°C

LOT RC546 2013-04  
**PROSIGNA**  
Reporter CodeSet  
NanoString  
65µL -80°C

LOT CP546 2013-04  
**PROSIGNA**  
Capture ProbeSet  
NanoString  
70µL -80°C

LOT RC546 2013-04  
**PROSIGNA**  
Reporter CodeSet  
NanoString  
65µL -80°C

LOT BRS-001 2013-04  
**PROSIGNA RNA**  
Reference Sample  
NanoString  
30 µl -80°C

LOT CP546 2013-04  
**PROSIGNA**  
Capture ProbeSet  
NanoString  
70µL -80°C

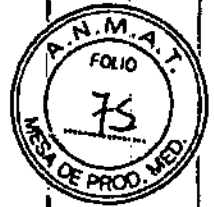
*[Handwritten mark]*

Dra. SILVIA CANELA  
DIRECTORA TECNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

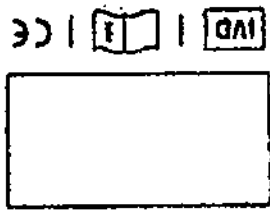
Lic. Alejandro Diez  
Gerente  
BioSystems S.A.

*[Handwritten mark]*

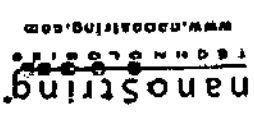
6 2 9 3



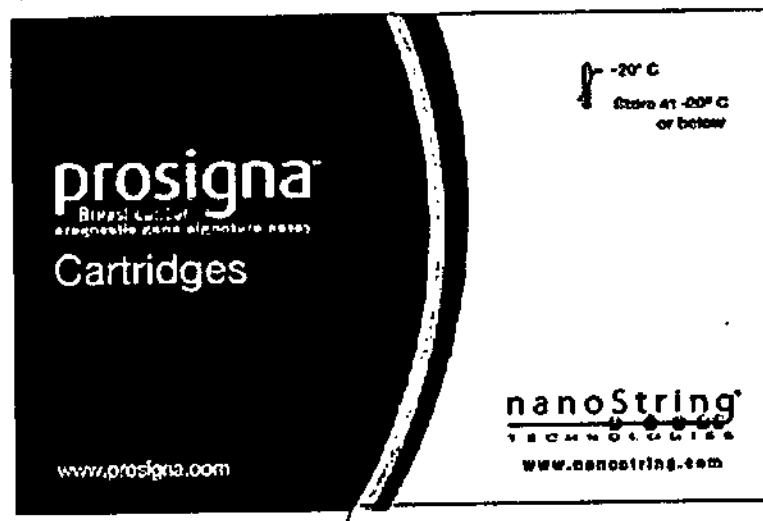
Prosigna Cartridges  
> PROYECTO DE ROTULO EXTERNO



© 2013 NanoString Technologies. All rights reserved.  
NanoString Cartridges logo, Prosigna and  
the Prosigna logo are trademarks or registered trademarks  
of NanoString Technologies.  
Printed in the USA  
LEL-C9171-02  
NanoString Technologies Inc.  
500 Fawcett Ave North, Suite 2000  
Sunnyvale, CA 94085 USA  
dnp@nanosttring.com  
800-355-1440  
Emergo Europe  
Mortelara 18  
3613 Bld, The Hague  
The Netherlands  
Phone: +31.70.344.8570



Prosigna Cartridges  
www.prosigna.com



-20°C  
Store at -20°C  
or below

Prosigna Cartridges  
www.prosigna.com

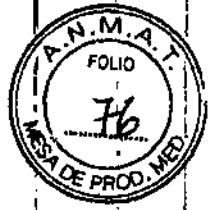
NanoString Technologies  
www.nanosttring.com

Handwritten mark.

Dra. SILVIA PANELA  
DIRECTORA TECNICA  
M. 10.42  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Poderado  
BioSystems S.A.

6203



Importado por:  
**BioSystems S.A**  
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)  
 TEL:(54-11)4854-7775  
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
 Uso Profesional Exclusivo

➤ PROYECTO DE ROTULO INTERNO



Prosigna Pre Pack

➤ PROYECTO DE ROTULO EXTERNO



*[Handwritten mark]*

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)  
 TEL:(54-11)4854-7775  
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
 Uso Profesional Exclusivo

*[Signature]*  
 Dra. SILVINA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MN 14421  
 BIOSYSTEMS S.A.

*[Signature]*  
 Lic. Alejandro Diez  
 Apoderado  
 BioSystems S.A.

629



PROYECTO DE ROTULO INTERNO

Contents

- nCounter Prep Station Tips, 3 each
- nCounter Cartridge Adhesive Cover, 6 each
- nCounter Tip Sheaths, 6 each
- nCounter Hybridization Buffer, 3 x 580 uL
- 12-Well Notched Strip Tubes, 12 each
- 12-Well Notched Strip Tube Lids, 12 each

LBL-00213-01

Dra. SILVANA LADELA  
DIRECTORA TECNICA  
AN 13021  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Poderado  
BIOSYSTEMS S.A.



6293

- ✓ nCounter compuesto por:
  - nCounter Prep Station

► PROYECTO DE ROTULO EXTERNO

# nCounter Prep Station 5s

Serial No.

Manufacture Date :

**Storage Condition:** Temperature=+5°C~+40°C

Humidity =15~75%RH

Barometric Pressure=70kPa (Min.)

**Transport Condition:** Temperature=-25°C~60°C

Humidity =15~75%RH

Barometric Pressure=70kPa (Min.)

**Precision System Science Co.,Ltd.**

Importado por:  
 BioSystems S.A  
 Av. Dorrego 673 (G1414CKB)  
 TEL:(54-11)4854-7775  
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
 Uso Profesional Exclusivo

*Handwritten initials*

Dra. SILVINA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
 Representante  
 BioSystems S.A.

*Handwritten signature*

6 2 9 3



> PROYECTO DE ROTULO INTERNO

**nanoString**  
TECHNOLOGIES

Model: nCounter  
Prep Station 5s  
Liquid Handling Robot

SN

NanoString Technologies  
530 Fairview Ave. N, Suite 2000  
Seattle, WA 98109

Power Source  
100-120 VAC  
200-240 VAC  
50/60Hz, 610VA

CE  
Laboratory Equipment

ETL  
Intertek  
5003481

Manufactured in Japan

nCounter Prep Station 5s Accessories

S/N:

Contents	Quantity
Tip Rack	1
Tip discarding box	1
Liquid Waste container	1
Power Cables (USA type)	1
O-ring	6
Silicon Grease	1

Handwritten mark resembling a stylized '10' or '170'.

Dra. SILVIA MANUELA  
DIRECTORA TECNICA  
MAY 14 2014  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
Biosystems S.A.

Handwritten signature or mark.



6 2 9 3



• nCounter Digital Analyzer




**nanostRING**  
 TECHNOLOGIES  
 Model: nCounter  
 Digital Analyzer 5s  
 Automated Epifluorescence Scanner

**SN 1110C0013**

Nanostring Technologies  
 530 Fairview Ave.N. Suite 2000  
 Seattle, WA 98109

**Power Source**  
 100-240 VAC  
 50/60Hz; 610VA

Manufactured in U.S.A.

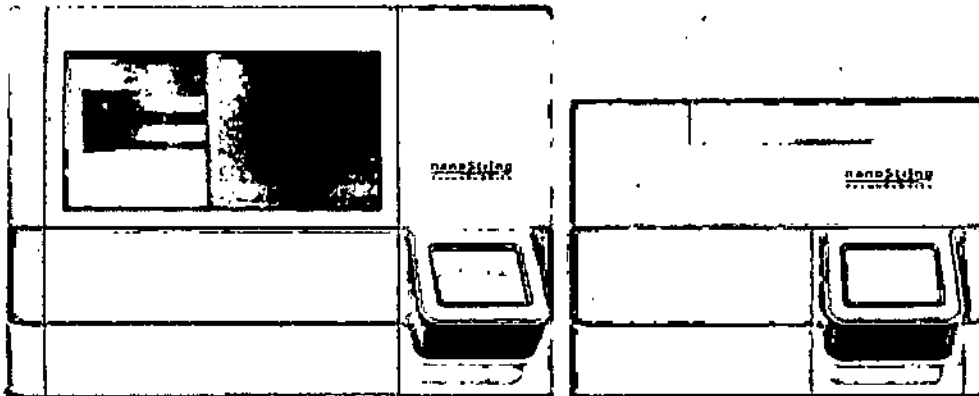
*JS*

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)  
 TEL: (54-11)4854-7775  
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421  
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro  
 Uso Profesional Exclusivo

*[Signature]*  
 Dra. SILVINA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 BIOSYSTEMS S.A.

*[Signature]*

*[Signature]*  
 Lic. Alejandro Diez  
 BIOSYSTEMS S.A.



## Manual de usuario del sistema de análisis nCounter® Dx



**NanoString Technologies®, Inc.**

530 Fairview Ave N  
Suite 2000  
Seattle, WA 98109 EE. UU.

[www.nanostring.com](http://www.nanostring.com)

Teléfono: +1 206.378.6268

+1888.358.NANO

Dirección de correo electrónico: [dxsupport@nanostring.com](mailto:dxsupport@nanostring.com)



*Para diagnósticos in vitro*

El sistema de análisis nCounter Dx, reseñado en este manual, debe utilizarse con las Pruebas de diagnóstico de NanoString, conforme al uso previsto en la Unión Europea, los Estados Unidos y otros mercados objetivo.

Dra. SILVINA ZANELLA  
DIRECTORA MÉDICA  
Biosystems S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Lic. de ejercicio  
Biosystems S.A.

2016-01 MAN-10008-03

6293



## Datos de contacto



### NanoString Technologies, Inc.

530 Fairview Ave N  
Suite 2000  
Seattle, WA 98109  
EE.UU.

Teléfono: +1 888 358.NANO (+1.888.358.6266)  
Fax: +1.206.378.6288

Dirección de correo electrónico: [dxsupport@nanosttring.com](mailto:dxsupport@nanosttring.com)  
Sitio web: [www.nanosttring.com](http://www.nanosttring.com)



### Representante autorizado en la Unión Europea:

Emergo Europe  
Molenstraat 15  
2513 BH, La Haya  
Países Bajos  
Europa +31.70.345.8570

### Titular del registro en Israel

EmergoIsrael  
Hashita St 19/1  
Yokneam Illit 20692 Israel  
Israel +972-77-5361147

Dirección de correo electrónico: [dxsupport@nanosttring.com](mailto:dxsupport@nanosttring.com)  
Sitio web: [www.nanosttring.com](http://www.nanosttring.com)

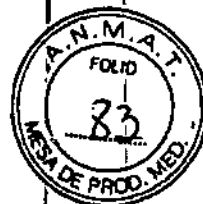
Dra. SILVIA CANELA  
DIRECTOR DE ZC:CA  
TEL: 421  
BIO SYSTEMS S.A.

Ux. Alejandro Diez  
L. Alejandro  
BioSystems S.A.

**nanosttring**  
TECHNOLOGIES

2016-01 MAN-10008-03

8 2 9 3



# 1 Introducción

## A. Limitaciones de uso del producto

El sistema de análisis nCounter Dx y el sistema de análisis nCounter Dx con la opción FLEX (cuando se utiliza en modo IVD) están pensados para ser utilizados en el diagnóstico *in vitro* junto con pruebas específicas de IVD autorizadas o aprobadas, citando su uso. El sistema de análisis nCounter Dx solo puede utilizarse con kits de prueba nCounter de NanoString.

El sistema de análisis nCounter Dx debe ser utilizado únicamente por profesionales adecuadamente formados. NanoString recomienda a todos los usuarios que lean y comprendan este manual antes de comenzar a utilizar el sistema. Guarde este manual en un lugar cercano a los instrumentos para acceder fácilmente a él, en caso de que sea necesario consultar las instrucciones o la información de seguridad. Si no se siguen las instrucciones especificadas en este manual, el operador podría encontrarse en situaciones de peligro y la garantía del fabricante quedará anulada.

## B. Componentes del producto

El sistema de análisis nCounter Dx consta de dos instrumentos: la Prep Station (estación de preparación) y el analizador digital. Se incluye un cable de alimentación para cada instrumento. La Prep Station (estación de preparación) también incluye una gradilla para puntas de pipeta, un recipiente para residuos líquidos, un recipiente para residuos sólidos y grasa de silicona.

Además del software del instrumento, se incluye una aplicación de software en línea (aplicación web) para configurar los ciclos, observar el estado de las muestras y descargar informes sobre las mismas.

## C. Descripción general del procedimiento

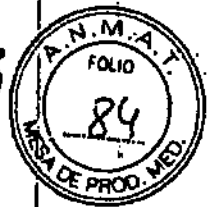
1. La aplicación web se utiliza para identificar y añadir comentarios a las muestras y determinar la prueba que se realizará.
2. Una vez que el procesamiento e hibridación de las muestras se han llevado a cabo según las instrucciones del kit de pruebas, estas se introducen en la Prep Station (estación de preparación) para su purificación e inmovilización en la superficie interna de un cartucho de muestra (2-3 horas, en función del número de muestras).
3. El cartucho de muestra se transfiere al analizador digital para la captura de imágenes y análisis (aproximadamente 4,5 horas, o 20-25 minutos por muestra).
4. Durante el procesamiento con el sistema de análisis nCounter Dx, puede utilizarse la aplicación web para hacer un seguimiento de los estados de las muestras.
5. Por último, los informes sobre las muestras están disponibles para su descarga a través de la aplicación web.

4  
Dra. SILVANA VUELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.I. 421  
BIOSYSTEMS S.A.

2016-01 MAN-10008-03

nanoString  
TECHNOLOGIES

Lic. Alejandro Diez  
Rodríguez  
BIOSYSTEMS S.A.



### D. Convenciones del manual

En este manual se utilizan las siguientes convenciones, que se describen a continuación.

Estilo de texto	Significado
<b>Negrita</b>	El texto en negrita suele utilizarse para destacar un botón, una combinación de lectas o una opción de menú. Puede aparecer texto en negrita en otros lugares, para destacar texto o términos importantes.
<i>Cursiva</i>	El texto en cursiva suele utilizarse para destacar referencias a otra sección o a otro capítulo del manual. También puede utilizarse texto en cursiva para destacar referencias a otros manuales o instrucciones.
<b>Azul</b>	El texto azul suele utilizarse para destacar referencias a figuras o tablas. También puede utilizarse texto azul para indicar hipervínculos activos que llevan a contenido en línea o direcciones de correo electrónico.

**NOTA:** Este símbolo indica información general que puede resultar útil a la hora de realizar una prueba. Estas notas pueden aclarar otras instrucciones o proporcionar indicaciones para aumentar la eficiencia del flujo de trabajo de la prueba.

**¡** **IMPORTANTE:** Este símbolo indica información importante a la hora de realizar una prueba.

**⚠** **PRECAUCIÓN:** Este símbolo indica la posibilidad de que se produzcan lesiones o daños en el instrumento si no se siguen correctamente las instrucciones. Lea atentamente y siga siempre las instrucciones acompañadas por este símbolo para evitar posibles peligros.

### E. Especificaciones del instrumento

Muestras de prueba por ciclo	1-10
Peso	Prep Station (estación de preparación) 5s: 120 kg
	Analizador digital 5s: 66 kg
Dimensiones (ancho x fondo x alto)	Prep Station (estación de preparación) 5s: 89 x 67 x 63 cm
	Analizador digital 5s: 66 x 66 x 48 cm
Requisitos de alimentación	100-240 V CA, 610 V CA
Fusible	8A (100-120 V CA) o 4A (200-240 V CA)

*JP*

Dra. SILVINA CAÑELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

*[Handwritten signature]*



## F. Precauciones complementarias

- El analizador digital es un producto láser de clase 1, y el instrumento contiene un lector de código de barras láser de clase 2 interno. Es posible que se produzca una exposición a la radiación láser de clase 2, cuando la tapa del analizador digital se encuentra abierta. No mire fijamente al rayo del láser del lector de código de barras.
- La Prep Station (estación de preparación) cuenta con módulos de calentamiento y alta tensión, que están señalizados mediante símbolos en la cubierta. No toque los electrodos ni el módulo de calentamiento. El instrumento está equipado con un bloqueo de seguridad que evita que se transmita voltaje cuando la compuerta del instrumento se encuentra abierta.
- No utilice este dispositivo cerca de fuentes de vibración o radiación electromagnética potentes, ya que pueden afectar el funcionamiento correcto.
- No trate de instalar, mover ni desmontar los instrumentos.
- Respete los sensores de la compuerta (si no lo hace, podría pelizarse los dedos).
- Asegúrese de que todos los productos estén correctamente colocados en el sistema antes de comenzar un procedimiento.
- Utilice el sistema empleando únicamente los kits de prueba nCounter de NanoString de acuerdo con su uso previsto.
- Use guantes mientras utiliza los instrumentos o realiza tareas de mantenimiento de los mismos.
- No trate de lavar los electrodos de la Prep Station (estación de preparación) ni deje que los electrodos entren en contacto con agua u otros disolventes.
- No trate de lavar la pantalla(tábil) del instrumento ni deje que las pantallas táctiles entren en contacto con agua u otros disolventes.

## G. Símbolos de precaución



**PELIGRO BIOLÓGICO:** Una fuente biológica representa un posible peligro. Si utilizan en su Prep Station (estación de preparación) materiales que representan un peligro biológico, el instrumento puede contaminarse con dichos materiales. Si utiliza materiales que representen un peligro biológico, utilice el etiquetado de advertencia correspondiente en su Prep Station (estación de preparación). No toque esta zona sin guantes ni sin el equipo de protección personal adecuado.



**PELIGRO ELÉCTRICO**



**PRECAUCIÓN: SUPERFICIE CALIENTE**

## H. Requisitos medioambientales

- Temperatura: 18-28°C
- Humedad: <80% humedad relativa (sin condensación)

*P*

## 2 Descripción general del hardware

### A. Información general

El número de serie del instrumento y la información sobre cumplimiento se encuentran en la placa de características ubicada en el panel posterior de cada instrumento. Si desea obtener información sobre el cumplimiento, consulte la placa de características y la declaración de conformidad (sólo para la Unión Europea).

Ambos instrumentos incluyen una pantalla táctil para ser utilizados. La pantalla táctil es un mecanismo sensible al tacto que permite al usuario controlar el instrumento seleccionando las opciones en la pantalla. Existen varios botones que aparecen en la interfaz de usuario de la pantalla táctil. Por ejemplo:

- Next (Siguiente): dirige a la pantalla siguiente.
- Back (Atrás): dirige a la pantalla anterior.
- Cancel (Cancelar): dirige al inicio del flujo de trabajo actual o al menú principal.

### B. Prep Station (Estación de preparación)

La Prep Station (estación de preparación) es un robot pipeteador multicanal configurado específicamente para su uso con los kits de pruebas nCounter de NanoString. El instrumento realiza transferencias de líquidos, separaciones mediante esferas magnéticas y la inmovilización de marcadores moleculares en la superficie del cartucho de muestra (FIGURA 2.1).

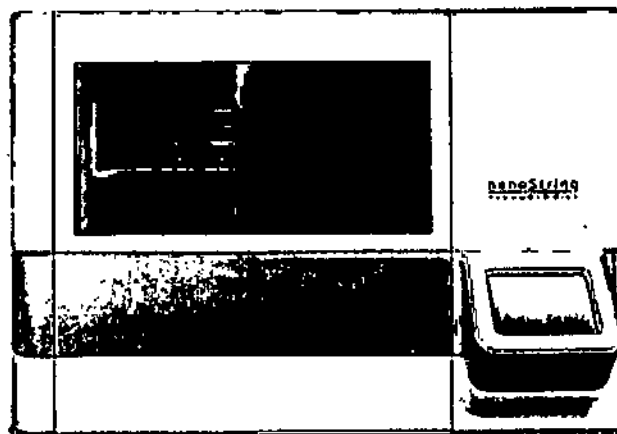


FIGURA 2.1: la Prep Station (estación de preparación)

La cubierta de la Prep Station (estación de preparación) debe cargarse con los productos adecuados antes de utilizarse (FIGURA 2.2).

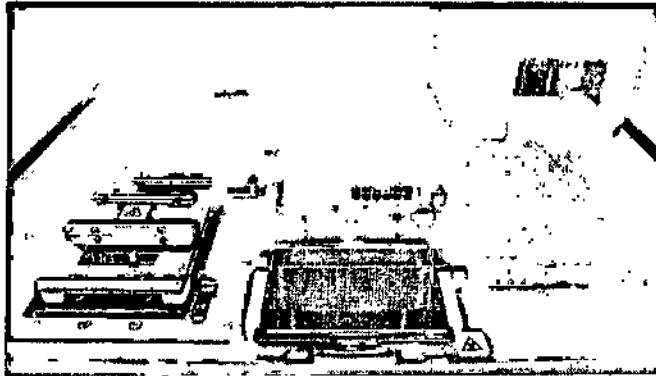


FIGURA 2.2: la cubierta de la Prep Station (estación de preparación)

### C. Analizador digital

El analizador digital es un escáner de epifluorescencia multicanal configurado específicamente para su uso con los cartuchos de kits de pruebas nCounter de NanoString. Se pueden cargar hasta seis cartuchos en el instrumento (FIGURA 2.3). Una vez que se hayan realizado uno o más escaneos, el instrumento puede detenerse para cambiar los nuevos cartuchos sin interrumpir el funcionamiento de los cartuchos restantes.

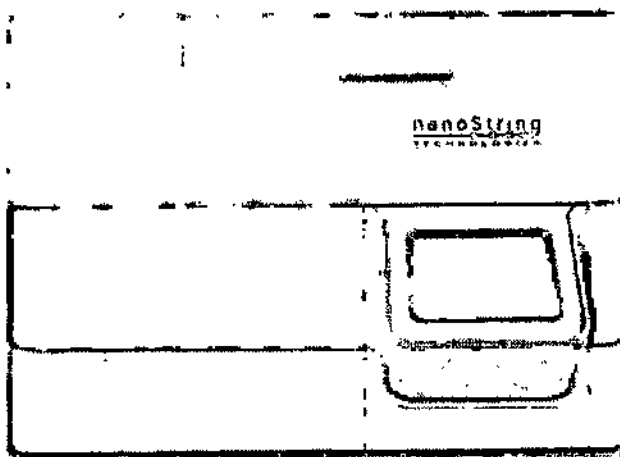


FIGURA 2.3: el analizador digital

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*  
 Dra. SILVIA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 4421  
 BIOSYSTEMS S.A.

*[Handwritten signature]*  
 Lic. Alejandro Diez  
 Apoderado  
 Biosystems S.A.

*[Handwritten signature]*



### 3 Selección del modo de instrumento

Los usuarios que cuenten con la opción FLEX pueden utilizar sus instrumentos en los modos de aplicación Life Sciences (Ciencias de la vida) o Diagnostics (Diagnóstico) (Dx). El Servicio técnico de NanoString debe activar la opción FLEX.

**NOTA:** Si la opción FLEX no se ha activado, las instrucciones descritas en este capítulo no se aplicarán; solo estará disponible el modo de aplicación Diagnostics (Diagnóstico). Continúe con el Capítulo 4.

Todas las pruebas IVD de NanoString deben realizarse con el modo Diagnostics (Diagnóstico) activado en estos instrumentos. En el modo Diagnostics (Diagnóstico), existen procedimientos y controles que limitan el acceso a los datos y a algunas de las funciones a los usuarios autorizados. Para el resto de aplicaciones, los usuarios que utilicen nCounter CodeSets o nCounter Elements deben elegir el modo Life Sciences (Ciencias de la vida) y consultar el manual de usuario del nCounter Analysis System para obtener más instrucciones.

#### A. Prep Station (Estación de preparación)

##### Select Instrument Mode (Seleccionar modo de Instrumento)

Tras encender la Prep Station (estación de preparación), en la primera pantalla que aparece se solicita al usuario que seleccione el modo Diagnostics (Diagnóstico) (azul, a la izquierda) o el modo Life Sciences (Ciencias de la vida) (verde, a la derecha).

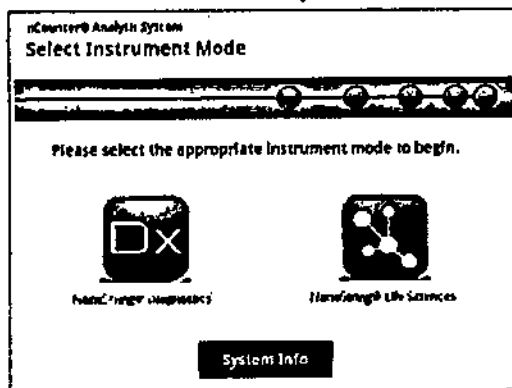


FIGURA 3.1: la pantalla "Select Instrument Mode" (Seleccionar modo del instrumento) de la Prep Station (estación de preparación)

Toque el icono azul etiquetado como NanoString® Diagnostics (Diagnóstico de NanoString®) para entrar en el modo Diagnostics (Diagnóstico). El sistema cargará la aplicación y mostrará la pantalla Welcome (Bienvenida) (FIGURA 3.2). Para utilizar la Prep Station (estación de preparación), el usuario debe iniciar sesión seleccionando el botón Main Menu (Menú principal).

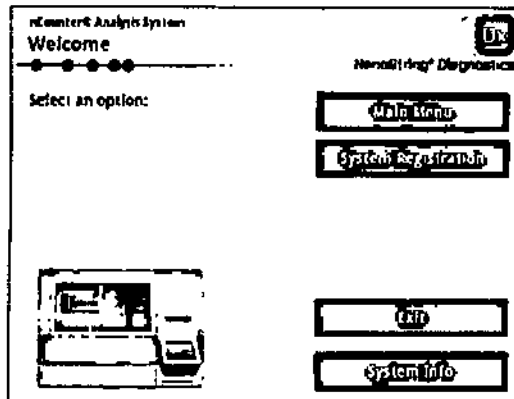


FIGURA 3.2: la pantalla "Welcome" (Bienvenida)

>>> Aparecerá la pantalla de inicio de sesión (FIGURA 3.3)

Introduzca un nombre de usuario y contraseña válidos y toque el botón Sign In (Iniciar sesión).

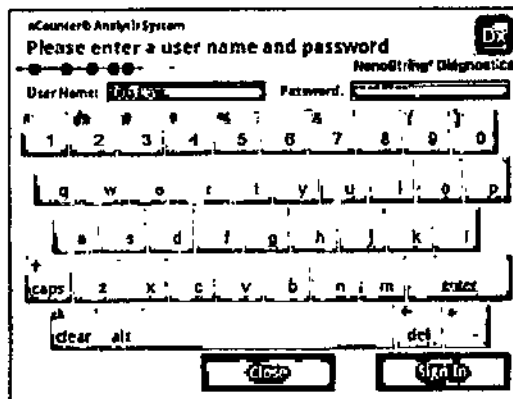


FIGURA 3.3: la pantalla de inicio de sesión

>>> Aparecerá Main Menu (Menú principal) (FIGURA 3.4).

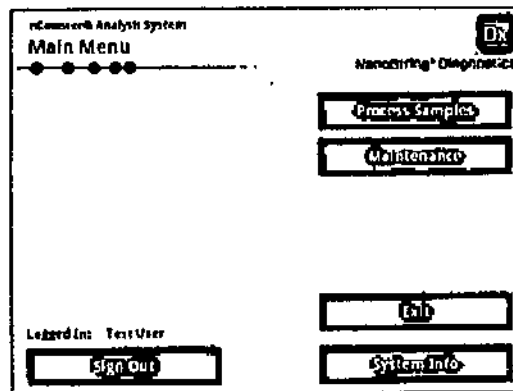


FIGURA 3.4: la pantalla Main Menu (Menú principal) de la Prep Station (estación de preparación) en el modo Diagnostics (Diagnóstico)

## Switch Instrument Mode (Cambiar modo de instrumento)

El usuario puede cambiar entre el modo Diagnostics (Diagnóstico) y el modo Life Sciences (Ciencias de la vida) del Main Menu (Menú principal). Pulse el botón Exit (Salir), ubicado en la parte inferior de Main Menu (Menú principal) (FIGURE 3.4).

>>> Aparecerá la pantalla de confirmación "Exit Diagnostics Mode" (Salir del modo Diagnóstico).

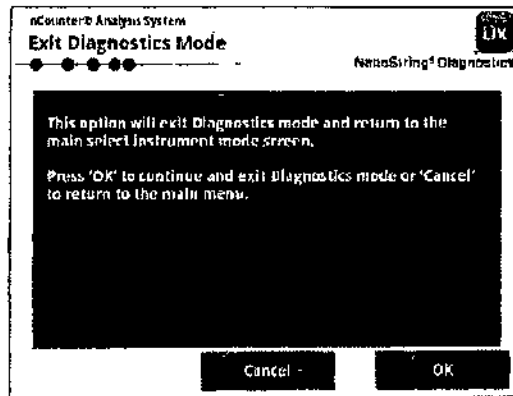


FIGURA 3.5: la pantalla de confirmación "Exit Diagnostics Mode" (Salir del modo Diagnóstico) de la Prep Station (estación de preparación)

Toque OK (Aceptar) para salir del modo Diagnostics (Diagnóstico) y volver a la pantalla "Select Instrument Mode" (Seleccionar modo del instrumento) (FIGURA 3.1) Toque Cancel (Cancelar) para volver a Main Menu (Menú principal)

## B. Analizador digital

### Select Instrument Mode (Seleccionar modo de instrumento)

Tras encender el analizador digital, en la primera pantalla que aparece se solicita al usuario que seleccione el modo Diagnostics (Diagnóstico) (azul, a la izquierda) o el modo Life Sciences (Ciencias de la vida) (verde, a la derecha).

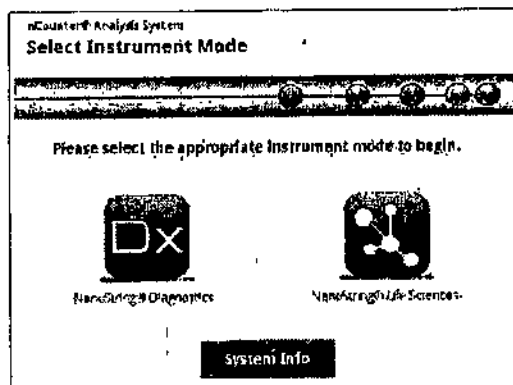


FIGURA 3.6: la pantalla "Select Instrument Mode" (Seleccionar modo del instrumento) del analizador digital

Toque el icono azul etiquetado como NanoString® Diagnostics (Diagnóstico de NanoString®) para entrar en el modo Diagnostics (Diagnóstico). El sistema cargará la aplicación y mostrará la pantalla Welcome (Bienvenida) (FIGURA 3.7). Para utilizar el analizador digital, el usuario debe iniciar sesión seleccionando el botón Main Menu (Menú principal).

623

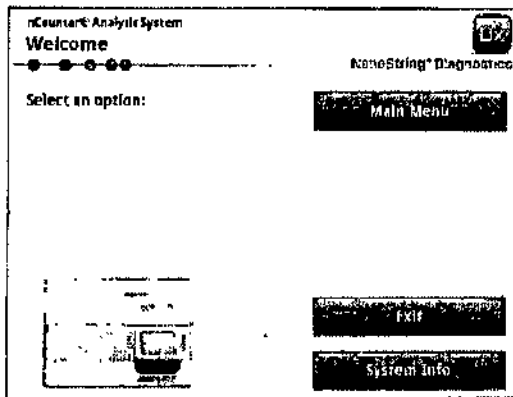


FIGURA 3.7: la pantalla "Welcome" (Bienvenida)

>>> Aparecerá la pantalla de inicio de sesión (FIGURA 3.8).

Introduzca un nombre de usuario y contraseña válidos y pulse el botón Sign In (Iniciar sesión)

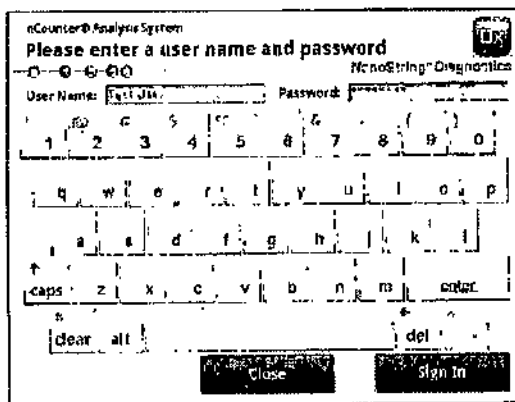


FIGURA 3.8: la pantalla de inicio de sesión

>>> Aparecerá Main Menu (Menú principal) (FIGURA 3.9).

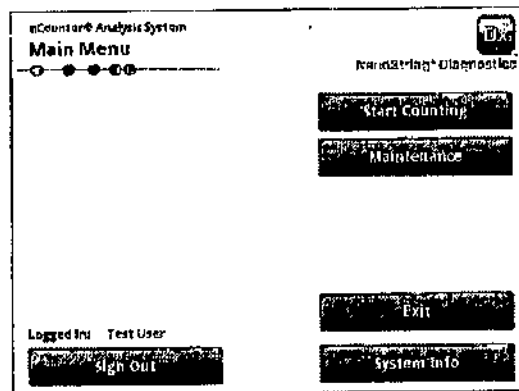


FIGURA 3.9: la pantalla Main Menu (Menú principal) del analizador digital en el modo Diagnostics (Diagnóstico)

### Switch Instrument Mode (Cambiar modo de instrumento)

El usuario puede cambiar entre el modo Diagnostics (Diagnóstico) y el modo Life Sciences (Ciencias de la vida) del Main Menu (Menú principal). Pulse el botón Exit (Salir), ubicado en la parte inferior de Main Menu (Menú principal) (FIGURE 3.8).

>>> Aparecerá la pantalla de confirmación "Exit Diagnostics Mode" (Salir del modo Diagnóstico).

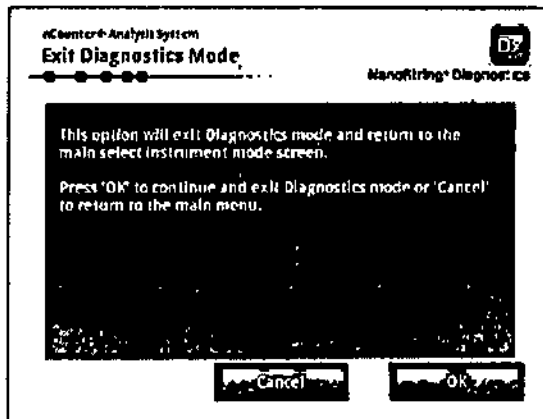


FIGURA 3.10: la pantalla de confirmación "Exit Diagnostics Mode" (Salir del modo Diagnóstico) del analizador digital

Toque OK (Aceptar) para salir del modo Diagnostics (Diagnóstico) y volver a la pantalla "Select Instrument Mode" (Seleccionar modo de Instrumento) (FIGURA 3.6). Toque Cancel (Cancelar) para volver a Main Menu (Menú principal).

## 4 Funcionamiento de la aplicación web

En este capítulo se ofrecen instrucciones para utilizar la aplicación web nCounter, que se encuentra en el servidor interno del analizador digital nCounter. Cuando el sistema se conecta a una red, la aplicación web puede utilizarse para comunicarse con la Prep Station (estación de preparación) y el analizador digital. Sus principales funciones son:

- Crear y editar series de ciclos
- Ver el estado de las series de ciclos
- Descargar informes
- Realizar funciones administrativas

### A. Inicio de sesión y gestión de perfiles

#### Inicio de sesión

6293



El administrador local del sistema nCounter debe proporcionar a cada usuario la dirección URL para acceder a la aplicación web nCounter y configurar la cuenta de usuario. Diríjase a la dirección URL que le han proporcionado desde cualquier equipo conectado a la red local de la organización (debe ser la misma red utilizada por el analizador digital). Aparecerá la página de inicio de sesión. Introduzca el ID de usuario y la contraseña que le ha proporcionado el administrador, seleccione el tipo de prueba que desee realizar y haga clic en Sign In (Iniciar sesión) (FIGURA 4.1)

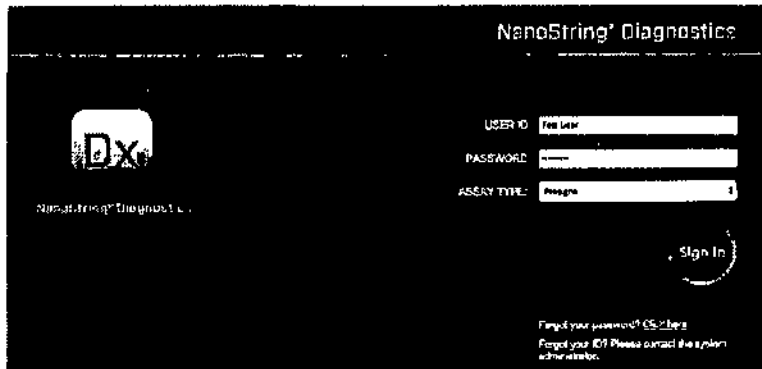


FIGURA 4.1: la página de inicio de sesión de la aplicación web nCounter

### ID de usuario/contraseña olvidados

Si ha olvidado su ID de usuario, póngase en contacto con el administrador local del sistema nCounter para recuperarla

Si ha olvidado la contraseña, la aplicación web nCounter puede recuperarla. Haga clic en el enlace junto a "Forgot your password?" (¿Ha olvidado su contraseña?) para acceder a la página de envío de contraseña olvidada (FIGURA 4.2).

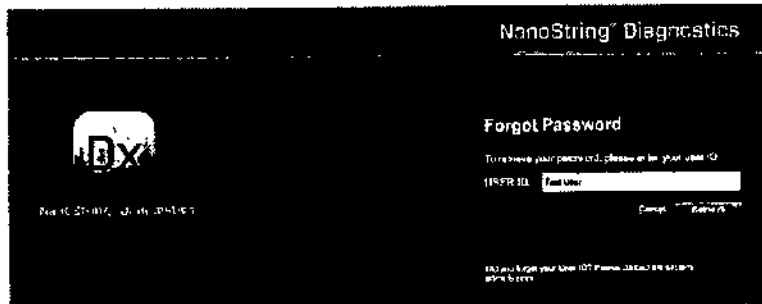


FIGURA 4.2: la página de envío de contraseña olvidada

Introduzca el ID de usuario. Si el sistema nCounter encuentra un perfil coincidente, la contraseña se enviará por correo electrónico a la dirección registrada (FIGURA 4.3). Si no se encuentra el perfil coincidente, se le indicará al usuario que se ponga en contacto con el administrador del sistema nCounter para restablecer la contraseña.



FIGURA 4.3: la página de confirmación de contraseña olvidada

nanoString  
TECHNOLOGIES

Dra. SILVANA ZANGELA  
2016-01-11 AMAN:10008-03  
MEXICO PARA TECNICA  
MN 14.421  
BYOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Moderador  
BioSystems S.A.

### Actualización de My Profile (Mi perfil)

La información de usuario puede actualizarse seleccionando el botón My Profile (Mi perfil) en la barra de menús ubicada en la parte superior de la página (FIGURA 4.4).

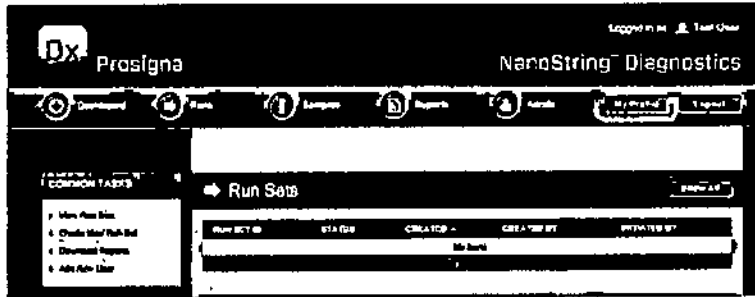


FIGURA 4.4: Ubicación del botón My Profile (Mi perfil)

La página "My Profile" (Mi perfil) permite al usuario cambiar la contraseña de la cuenta y/o la dirección de correo electrónico asociadas al perfil y ver otra información de la cuenta (FIGURA 4.5). Consulte la sección G: Gestionar usuarios para obtener más información sobre los tipos de usuario y sus privilegios.

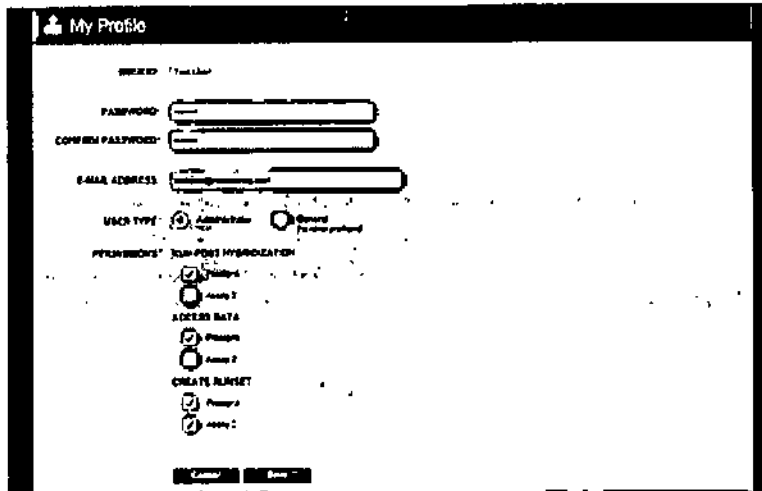


FIGURA 4.5: la página "My Profile" (Mi perfil)

Para aceptar cualquier cambio realizado en el perfil, haga clic en el botón Save (Guardar). Para descartar cualquier cambio y volver a la página anterior, haga clic en el botón Cancel (Cancelar).

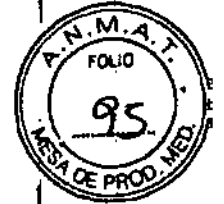
## B. Navegación y presentación general de la aplicación

### Menú

La aplicación web nCounter cuenta con una barra de menús en la parte superior, que permite a los usuarios navegar rápidamente de una sección de la aplicación a otra (FIGURA 4.6). Los elementos del menú separan la aplicación en cinco secciones:

- Dashboard (Panel de control): tareas comunes y estado de actividades recientes
- Runs (Ciclos): cree una serie de ciclos y vea el estado de los ciclos (una serie de ciclos consta de entre 1 y 10 muestras de diagnóstico y

629131



dos muestras de referencia obligatorias procesadas simultáneamente)

- **Samples (Muestras):** visualización del estado de las muestras
- **Reports (Informes):** descarga de informes
- **Admin:** gestión de usuarios y otros ajustes del sistema

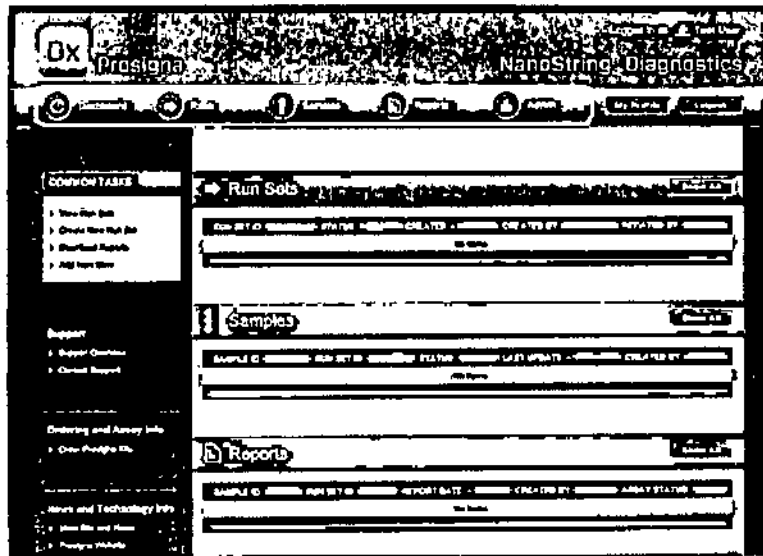


FIGURA 4.6: el menú principal de la aplicación web

La mayoría de las opciones del menú cuentan con submenús que se muestran cuando el usuario pasa por encima del elemento (FIGURA 4.7). Si no hay submenús disponibles, el usuario puede hacer clic en el elemento de menú.

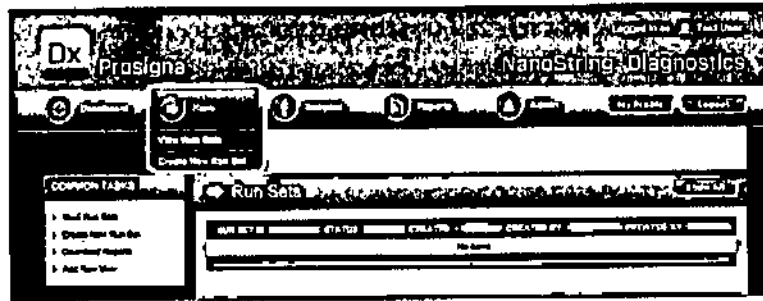


FIGURA 4.7: los submenús están disponibles para algunas opciones de menú

### Tablas

La aplicación web nCounter muestra tablas de visualización rápida del estado de series de ciclos, del estado de muestras, de usuarios y de informes.

### Filtro

Las tablas pueden alcanzar un gran tamaño después de utilizar con frecuencia la aplicación web nCounter, dificultando la búsqueda de datos de interés. La opción de filtrado está disponible en todas las tablas con el fin de permitir a los usuarios que busquen y visualicen únicamente los datos de interés.

De forma predeterminada, la opción de filtrado está desactivada en la mayoría de las páginas de estado (existe una excepción: las muestras de referencia se filtran de forma predeterminada en la página "Samples" (Muestras)). Para activar la opción de filtrado, haga clic en el signo "+" junto al encabezado Filter Settings (Configuración de filtro). El encabezado se expandirá y mostrará la configuración de filtro disponible (FIGURA 4.8).

*Handwritten signature*



2016-01-14 10:00:08-03  
DRA. SILVIA CANELA  
REG. EN TECNICA  
14/21  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Rodrigo  
BioSystems S.A.

*Handwritten signature*



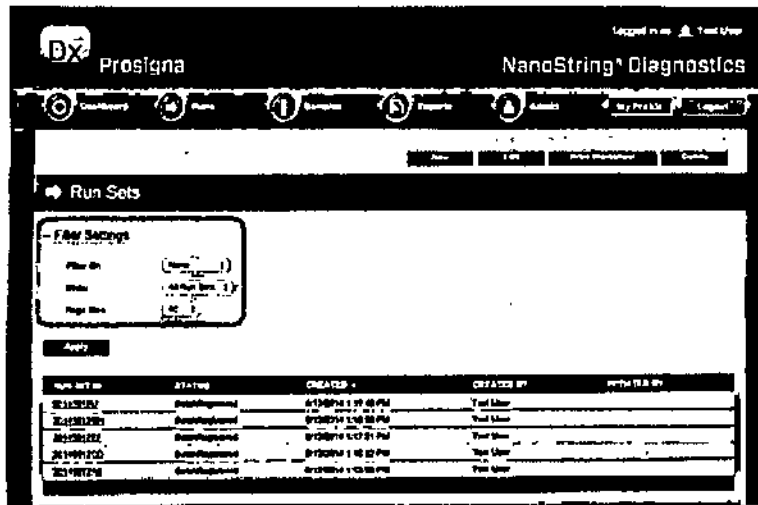


FIGURA 4.8: la configuración de filtro está disponible al visualizar la mayoría de los datos

NOTA: La opción de filtrado no está disponible para la página "Manage Users" (Gestionar usuarios).

Los usuarios pueden filtrar datos utilizando cualquiera de los campos mostrados en la tabla. Esto devolverá los elementos que coincidan con el texto introducido en cualquier lugar de ese campo. Asimismo, los usuarios pueden elegir mostrar todos los elementos, o solo los elementos creados recientemente, indicando el intervalo de tiempo de su interés. Para cambiar el número de elementos visualizados por página, seleccione el tamaño de página que desee desde el menú desplegable.

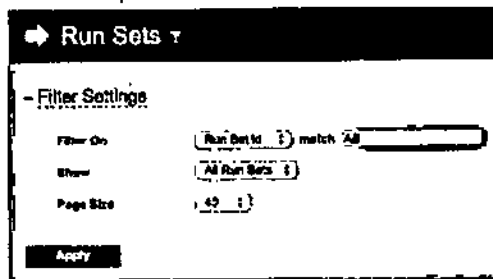


FIGURA 4.9: un ejemplo de configuración de filtro de la página "Run Sets" (Series de ciclos)

Haga clic en Apply (Aplicar) cuando finalice. Solo se mostrarán las filas relevantes en la tabla (FIGURA 4.10).

10

NOTA: La presencia o ausencia de un icono con forma de embudo junto al título de la página indica si la opción de filtrado se ha aplicado o no.

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.M. 42  
BIOSTIS, EMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Productor  
BioSystems G.A.

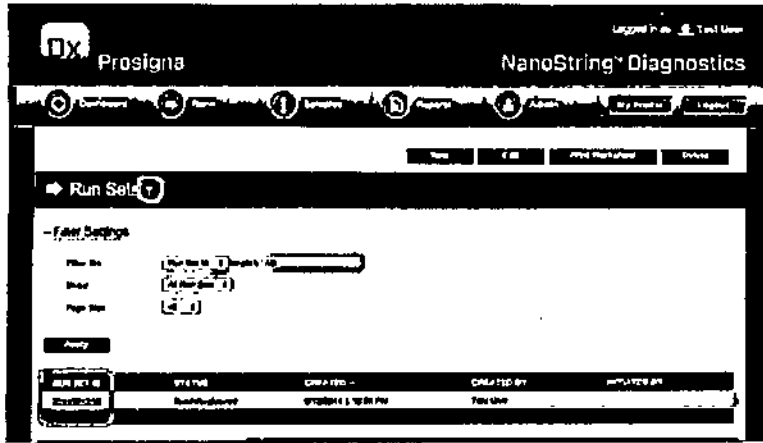


FIGURA 4.10: un ejemplo del icono con forma de embudo y los resultados filtrados de la página "Run Sets" (Series de ciclos)

Hay distintos filtros disponibles en función de la página mostrada. Por ejemplo, la página "Samples" (Muestras) ofrece la opción de ocultar las dos muestras de referencia necesarias para cada ciclo.

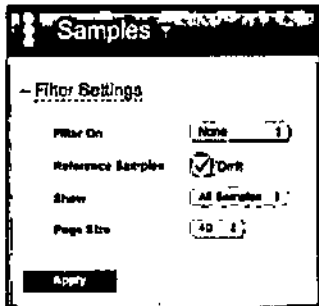


FIGURA 4.11: Marque la casilla de verificación "Omit" (Omitir) para mostrar u ocultar las muestras de referencia

Ordenar

Todas las columnas de la tabla permiten a los usuarios ordenar las filas mostradas en orden ascendente o descendente. Haga clic en el encabezado de la columna que incluye los datos que le interesan para ordenar las filas. Para volver a ordenar los datos en el orden inverso, haga clic de nuevo en el mismo encabezado de columna (FIGURA 4.12).

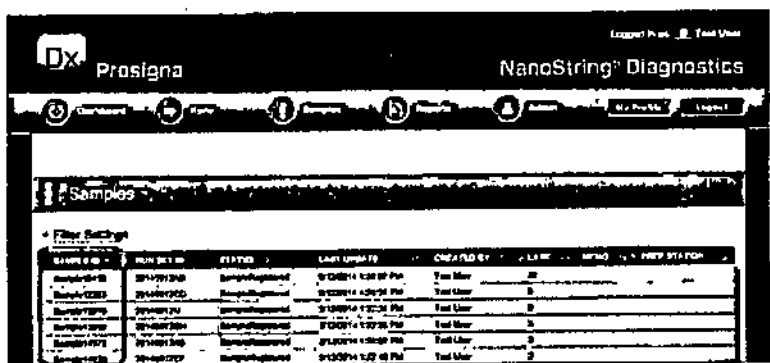


FIGURA 4.12: un ejemplo de clasificación alfabética de muestras haciendo clic en el encabezado de columna "SAMPLE ID" (ID de muestra)

13

NOTA: Las tablas suelen mostrarse de forma predeterminada con los elementos más recientes en la parte superior y los más antiguos en la parte inferior.



**Formularios**

Los formularios se definen en la aplicación web nCounter como páginas en las que el usuario puede realizar cambios en los datos de forma manual. Los usuarios generales con el privilegio de cuenta "Create Run Set" (Crear serie de ciclos) tienen acceso a los formularios "Create Run Set" (Crear serie de ciclos) y "Edit Run Set" (Editar serie de ciclos). Los usuarios que carezcan de este privilegio pueden ver el estado de las series de ciclos y las muestras, pero no pueden crear ni editar series de ciclos. Los administradores pueden acceder, además, a otros formularios, entre los que se incluyen:

- Add new user (Añadir nuevo usuario)
- Edit user (Editar usuario)
- Date and Time (Fecha y hora)
- IP Address (Dirección IP)
- SSH Settings (Configuración de SSH)
- E-mail Configuration (Configuración de correo electrónico)

Todos los formularios se han diseñado con la expectativa de que los usuarios realicen una acción antes de desplazarse a otra sección de la aplicación web. Para navegar a otra función tras completar un formulario, haga clic en Save (Guardar) para guardar la información que ha introducido, o en Cancel (Cancelar) para salir del formulario y omitir los cambios.

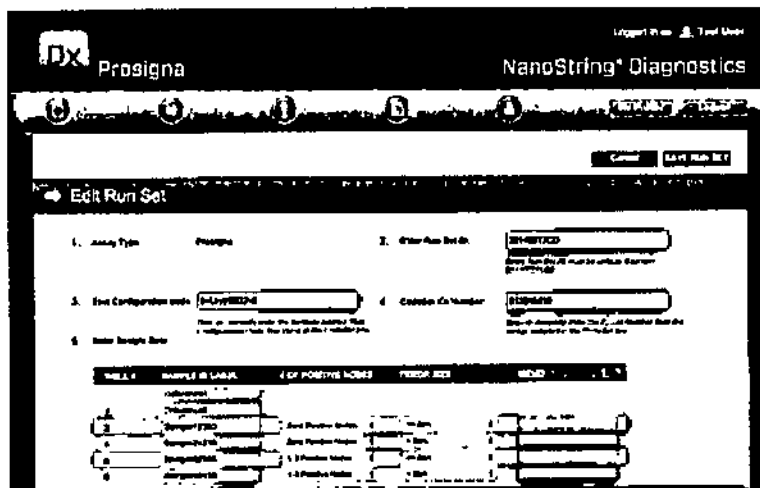


FIGURA 4.13: no se puede acceder a la barra de menús mientras se edita el contenido de un formulario

**C. Panel de control y páginas de estado**

**Dashboard (Panel de control)**

El Dashboard (Panel de control) es la página de inicio, la primera pantalla que se visualiza al iniciar sesión en la aplicación web nCounter. Se puede acceder al Dashboard (Panel de control) desde otras páginas haciendo clic en el elemento de menú Dashboard (Panel de control), pero no estará disponible mientras se edita un formulario hasta que este se haya guardado o se haya descartado.

8

Dra. SILVIA ANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Cooperador  
BIOSYSTEMS S.A.

8293

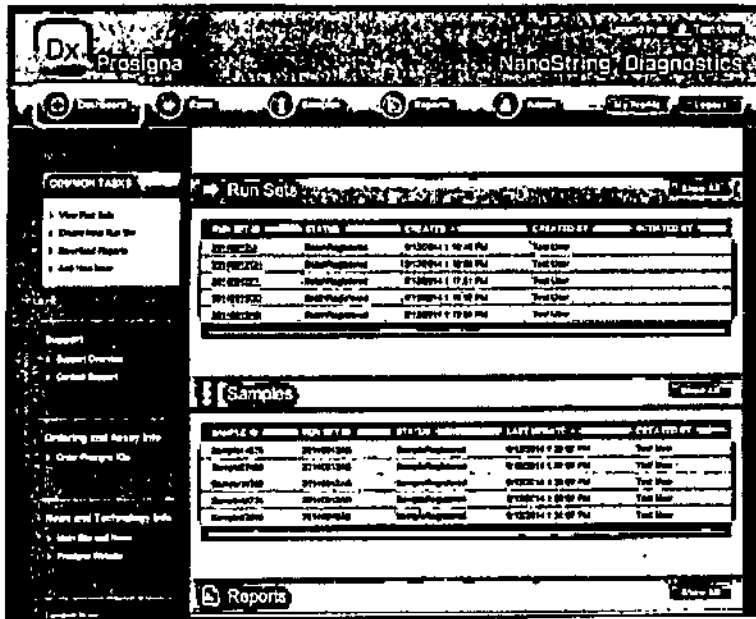


FIGURA 4.14: la página de inicio Dashboard (Panel de control) y la ubicación de la opción de menú Dashboard (Panel de control)

El Dashboard (Panel de control) ofrece rápido acceso a los estados de los Run Sets (Series de muestras), Samples (Muestras) y Reports (Informes) (asumiendo que se han aplicado los privilegios correspondientes al perfil de usuario). Para ver el estado completo de estas opciones, haga clic en el botón Show All (Mostrar todo), que aparece a la derecha de la barra de títulos de cada una de ellas.

El Dashboard (Panel de control) también le ofrece acceso rápido a tareas comunes ubicadas en el panel izquierdo de la página. Haga clic en el enlace correspondiente para navegar y realizar la acción que desee.

Se puede acceder a todas las navegaciones disponibles en el Dashboard (Panel de control) a través de la barra de menús de la parte superior (FIGURA 4.14). El Dashboard (Panel de control) ofrece una vista consolidada de estas navegaciones para realizar funciones de forma rápida y sencilla desde un único lugar.

### Estado de la serie de ciclos

Se puede acceder a la página "Run Sets" (Series de ciclos) desde el Dashboard (Panel de control), tal y como se ha descrito anteriormente, y también haciendo clic en Runs (Series) de la barra de menús.

La página "Run Sets" (Series de ciclos) muestra los estados de todas las series de ciclos que se han creado.

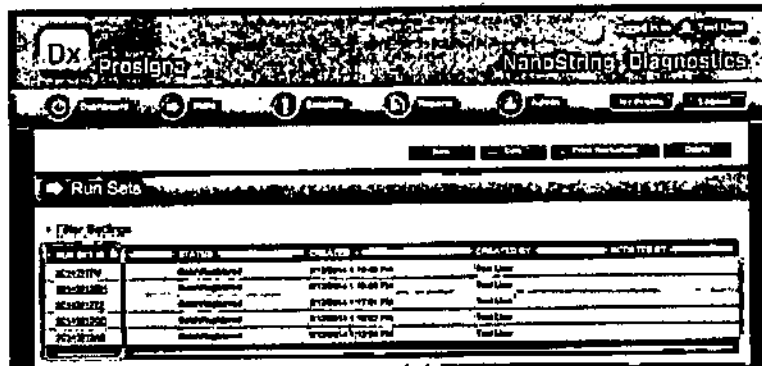


FIGURA 4.15: estados de todas las series de ciclos

6293



Aparecerá la siguiente información:

1. **Run Set ID** (ID de la serie de ciclos): el ID de la serie de ciclos introducido cuando esta se creó
2. **Status** (Estado): se muestra la condición o el estado actuales de la serie de ciclos. Entre las posibilidades de estado se incluyen:
  - **BatchRegistered**: Run Set Registered (Lote registrado - Serie de ciclos registrados) (la serie de ciclos se ha definido, pero aún no ha comenzado el procesamiento)
  - **PostHybProcessing**: Prep Station (estación de preparación) Processing (Procesamiento de poshibridación - Procesamiento de Prep Station (estación de preparación)): la serie de ciclos se está procesando en la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybComplete**: Prep Station (estación de preparación) Completed (Poshibridación finalizada - Prep Station (estación de preparación) finalizada), la serie de ciclos ha finalizado en la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybAbort**: Prep Station (estación de preparación) Abort (Anulación de poshibridación - Anulación de Prep Station (estación de preparación)): anulación manual de la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybError**: Prep Station (estación de preparación) Error (Error de poshibridación - Error de Prep Station (estación de preparación)): se ha producido un error durante el procesamiento en la Prep Station (estación de preparación)
  - **ScanProcessing**: DA Scan Processing (Procesamiento de escaneo - Procesamiento de escaneo de AD): se está realizando el procesamiento en el analizador digital
  - **ScanError**: DA Scan Error (Error de escaneo - Error de escaneo de AD) (se ha producido un error durante el procesamiento en el analizador digital)
  - **ScanAbort**: DA Scan Abort (Anulación de escaneo - Anulación de escaneo de AD) (anulación manual en el analizador digital)
  - **BatchComplete**: Batch Complete (Lote finalizado - Lote finalizado): ha finalizado el procesamiento de la serie de ciclos
  - **ReportPending**: Report Pending (Informe pendiente - Informe pendiente): escaneo finalizado, pero a la espera de que finalice el algoritmo
  - **ReportProcessing**: Report Processing (Procesamiento de Informes - Procesamiento de Informes): el algoritmo está funcionando, pero el informe aún no se ha generado
  - **ReportComplete**: Report Complete (Informe finalizado - Informe finalizado): el analizador digital ha finalizado el escaneo y los Informes están disponibles para su descarga en la página Reports (Informes)
  - **ReportError**: Report Failed (Error de informe - Error de informe) (todo el procesamiento de la serie de ciclos ha finalizado, pero no se ha generado ningún informe debido a un error en el algoritmo)
  - **ReportCompleteWithError**: Report Complete with Error (Informe finalizado con error - Informe finalizado con error) (todo el procesamiento de la serie de ciclos ha finalizado y se ha generado un informe, pero la prueba ha fallado)
3. **Created** (Fecha de creación): la fecha en que se creó inicialmente la serie de ciclos con la aplicación web
4. **Created By** (Creado por): el ID del usuario que creó la serie de ciclos con la aplicación web
5. **Initiated By** (Iniciado por): el ID de usuario que inició el procesamiento de la serie de ciclos en la Prep Station (estación de preparación)

Si desea ver más detalles de las muestras individuales de una serie de ciclos en concreto, haga clic en el hipervínculo de dicha serie de ciclos (FIGURA 4.15). La aplicación se dirigirá a la página "Samples" (Muestras) y mostrará la información de las muestras de la serie de ciclos seleccionada.

Dra SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
Mesa de Prod. Med.  
BIOSYSTEMS S.A.

2016-01 MAN-10008-03

nanoString®

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

### Estado de la muestra

De forma similar a lo que sucede con la página "Run Sets" (Series de ciclos), se puede acceder a la página "Samples" (Muestras) desde el Dashboard (Panel de control), así como desde la opción de menú Muestras (Muestras) de la parte superior de la página.

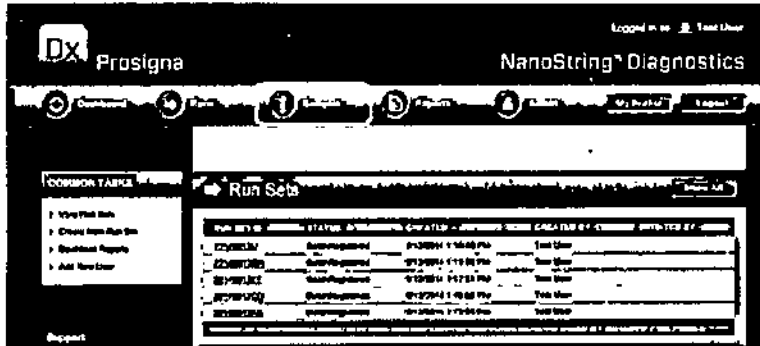


FIGURA 4.16: la ubicación de la opción de menú "Samples" (Muestras)

La página "Samples" (Muestras) permite a los usuarios visualizar los estados de todas las muestras de todas las series de ciclos.

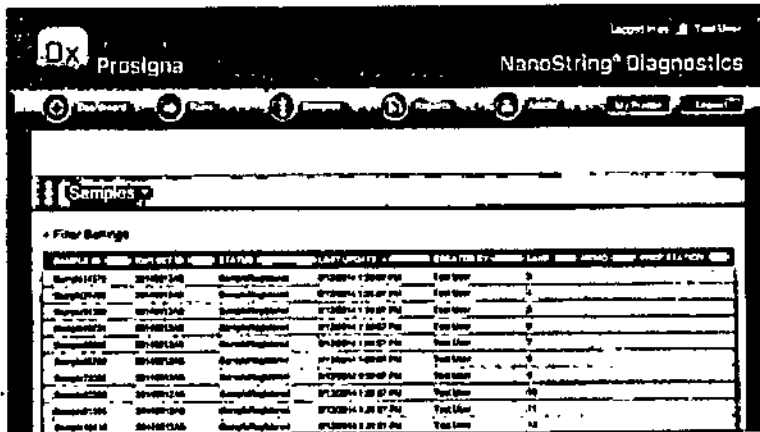


FIGURA 4.17: los estados de todas las muestras de todas las series de ciclos

to

6293



Aparecerá la siguiente información:

1. **Sample ID** (ID de la muestra): el ID de la muestra introducido manualmente o a través de un escáner de código de barras al crear la serie de ciclos
2. **Run Set ID** (ID de serie de ciclos): el ID de la serie de ciclos introducido al crear la serie de ciclos en la aplicación web
3. **Status** (Estado): se muestra la condición o el estado de la muestra. Se muestran posibles estados para una muestra:
  - **SampleRegistered**: Sample Registered (Muestra registrada - Muestra registrada): la muestra se ha definido; aún no ha comenzado el procesamiento
  - **PostHybProcessing**: Prep Station (estación de preparación) Processing (Procesamiento de poshibridación - Procesamiento de Prep Station (estación de preparación)): la serie de ciclos se está procesando en la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybComplete**: Prep Station (estación de preparación) Completed (Poshibridación finalizada - Prep Station (estación de preparación) finalizada): la serie de ciclos ha finalizado en la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybAbort**: Prep Station (estación de preparación) Abort (Anulación de poshibridación - Anulación de Prep Station (estación de preparación)): anulación manual de la Prep Station (estación de preparación)
  - **PostHybError**: Prep Station (estación de preparación) Error (Error de poshibridación - Error de Prep Station (estación de preparación)): se ha producido un error durante el procesamiento en la Prep Station (estación de preparación)
  - **ScanProcessing**: DA Scan Processing (Procesamiento de escaneo - Procesamiento de escaneo de AD): se está realizando el procesamiento en el analizador digital
  - **ScanError**: DA Scan Error (Error de escaneo - Error de escaneo de AD) (se ha producido un error durante el procesamiento en el analizador digital)
  - **ScanAbort**: DA Scan Abort (Anulación de escaneo - Anulación de escaneo de AD) (anulación manual en el analizador digital)
  - **ReportPending**: Report Pending (Informe pendiente - Informe pendiente): escaneo finalizado, pero a la espera de que finalice el algoritmo
  - **ReportProcessing**: Report Processing (Procesamiento de informes - Procesamiento de informes): el algoritmo está funcionando, pero el informe aún no se ha generado
  - **ReportComplete**: Report Complete (Informe finalizado - Informe finalizado): el analizador digital ha finalizado el escaneo y los informes están disponibles para su descarga en la página Reports (Informes)
  - **ReportError**: Report Failed (Error de informe - Error de informe): todo el procesamiento de la serie de ciclos ha finalizado, pero no se ha generado ningún informe debido a un error en el algoritmo
  - **ReportCompleteWithError**: Report Complete with Error (Informe finalizado con error - Informe finalizado con error) (todo el procesamiento de la serie de ciclos ha finalizado y se ha generado un informe, pero la prueba ha fallado)
4. **Last Update** (Última actualización): la fecha en que se cambió el estado de la muestra por última vez
5. **Created By** (Creado por): el ID del usuario que creó la serie de ciclos con la aplicación web
6. **Lane** (Canal): el canal donde se coloca la muestra en el cartucho
7. **Memo** (optional) (Memorando) (campo opcional): notas sobre la muestra introducida en el campo Memo (Memorando) del formulario Run Set (Serie de ciclos)
8. **Prep Station** (Estación de preparación): nombre de la Prep Station (estación de preparación) en la que se procesó la muestra; una característica útil si se ha conectado más de una Prep Station (estación de preparación) al analizador digital

32

Dra. SHIVIA ZAMIELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 421  
BIO SYSTEMS S.A.

2018-01 MAN-10008-03

nanoString  
LTS 421

Lic. Alejandro Diez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

62931



### D. Series de ciclos

Esta sección guía a los usuarios a través de la creación, edición, impresión y eliminación de series de ciclos.

#### Crear una serie de ciclos

Los usuarios deben crear una serie de ciclos, asociando los ID de las muestras a sus ubicaciones del pozo del tubo de tira mediante la aplicación web nCounter.

El usuario puede seleccionar la opción de crear una nueva serie de ciclos en varios lugares de la aplicación web. La forma más común consiste en seleccionar la opción Runs (Ciclos) de la barra de menús ubicada en la parte superior de la página y elegir Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos) en el submenú que aparece a continuación (FIGURA 4.18).

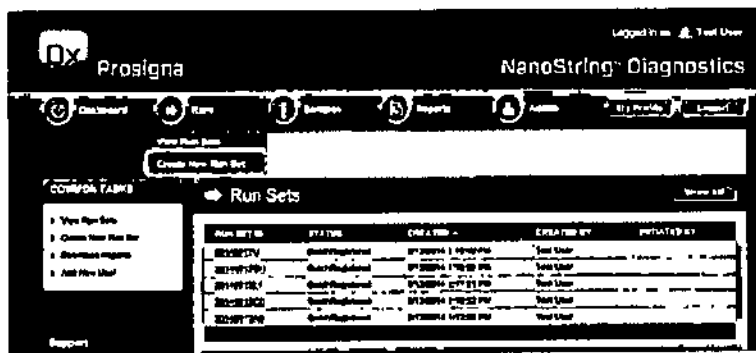


FIGURA 4.18: la opción Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos) se encuentra en el submenú Runs (Ciclos)

>>> Aparecerá el formulario "Create New Run Set" (Crear nueva serie de ciclos).

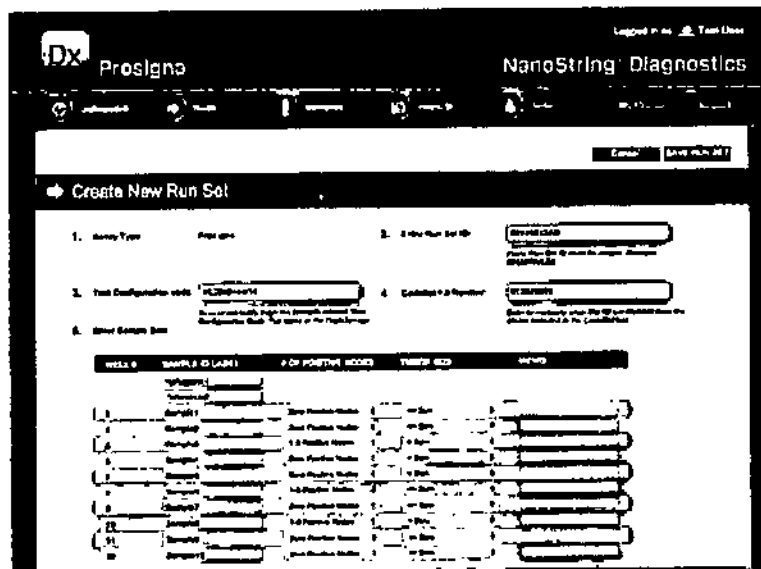
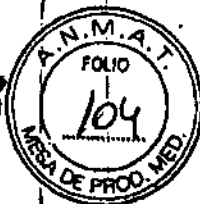


FIGURA 4.19: el formulario "Create New Run Set" (Crear nueva serie de ciclos)



6293



Introduzca la siguiente información para crear una serie de ciclos:

1. nCounter Assay Typo (Tipo de prueba nCounter): el tipo de prueba nCounter se seleccionó previamente al iniciar sesión (FIGURA 4.1). Para cambiar esta entrada, cierre sesión e inicie sesión de nuevo, seleccionando un nuevo tipo de prueba.
2. Run Set ID (ID de la serie de ciclos): el ID de la serie de ciclos debe identificar con un nombre único la serie de ciclos.
3. Test Configuration Code (Código de configuración de prueba): el código de configuración de prueba es un código de barras alfanumérico que se encuentra en la caja de CodeSet. Determina el número de muestras que se pueden procesar.
4. CodeSet Kit Number (Número de kit CodeSet): el número de kit CodeSet es un código de barras numérico que se encuentra en la caja de CodeSet; también se denomina CodeSet Barcode Sticker (Pegatina de código de barras CodeSet). Determina la fecha de caducidad de CodeSet. Dado que puede transcurrir algún tiempo entre la creación de una serie de ciclos y el procesamiento de las muestras, aparecerá una advertencia si en el momento de la creación de la serie de ciclos faltan menos de dos semanas para que caduque CodeSet.
5. Sample Data (Datos de muestra): las muestras de referencia están siempre ubicadas en los pozos 1 y 2; no necesitan introducirse ni pueden editarse. Los números de pozo 3-12 se utilizan para obtener muestras de ARN del paciente. Los campos pueden variar en diferentes tipos de pruebas. Por ejemplo, Prosigna requiere la siguiente información:
  - a. Sample ID Label (Etiqueta de ID de muestra) (campo obligatorio): los ID de muestras pueden introducirse mediante los tubos de muestras con códigos de barras y un escáner de código de barras conectado al ordenador. Si no cuenta con escáner o los códigos de barras están dañados, puede introducir manualmente con el teclado los ID de las muestras. NanoString recomienda el uso de ID de muestras únicos para realizar un seguimiento de las mismas.
  - b. # of Positive Nodes (N.º de ganglios positivos) (campo obligatorio): los usuarios pueden elegir entre zero positive nodes (ningún ganglio positivo), 1-3 positive nodes (1-3 ganglios positivos) o >=4 positive nodes (>=4 ganglios positivos).
  - c. Tumor Size (Tamaño del tumor) (campo obligatorio): los usuarios pueden elegir entre <= 2 cm o > 2 cm.
  - d. Memo (Memorando) (campo opcional): aquí se pueden introducir notas sobre la muestra. El límite máximo es de 32 caracteres.

**NOTA:** Deje el resto de campos en blanco si no necesita algún pozo de tubo de tira. Si necesita campos adicionales para más muestras, utilice una configuración de prueba diferente que tenga cabida para más muestras.

**IMPORTANTE:** Algunos escáneres manuales pueden malinterpretar los códigos de barras si no están correctamente configurados. Es fundamental introducir correctamente el Test Configuration Code (Código de configuración de prueba) y el CodeSet Kit Number (Número de kit CodeSet). Si detecta algún error, póngase en contacto con [dmsupport@nanosttring.com](mailto:dmsupport@nanosttring.com) para solicitar ayuda.

6. Set E-mail Recipients (Establecer destinatarios de correo electrónico): si lo desea, elija destinatarios de correo electrónico seleccionando usuarios de la lista de contactos de la izquierda y haciendo clic en el botón Add>> (Añadir). Por otra parte, los destinatarios de correo electrónico pueden eliminarse seleccionando los usuarios de la lista de la derecha y haciendo clic en el botón <<Remove (Eliminar). Pulse la tecla Ctrl (o la tecla Comando si utiliza un ordenador Apple) del teclado mientras selecciona varias direcciones para añadir o eliminar varios destinatarios de una sola vez.
  - a. E-mail Status Updates to (Actualizaciones de estado por correo electrónico a): los usuarios asignados aquí recibirán actualizaciones por correo electrónico cuando cambie el estado de la serie de ciclos.
  - b. E-mail Report Notifications to (Notificaciones de informes por correo electrónico a): los usuarios asignados aquí recibirán un correo electrónico cuando los informes de las muestras de la serie de ciclos estén disponibles para su descarga. Los correos electrónicos incluirán un enlace para iniciar sesión y descargar los informes de nCounter pertinentes.

**NOTA:** El usuario debe tener configurados los permisos adecuados en su perfil de usuario para poder recibir notificaciones de informes por correo electrónico. Aparecerá un mensaje de error cada vez que se intente asignar un usuario sin la opción de recibir notificaciones de informes. Para cambiar estos permisos, un administrador debe editar el perfil del usuario y añadir el privilegio.

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M 14.21  
BIO SYSTEMS S.A.

nanosttring

Lic. Alejandro Díez  
representante  
BIO SYSTEMS S.A.

6293

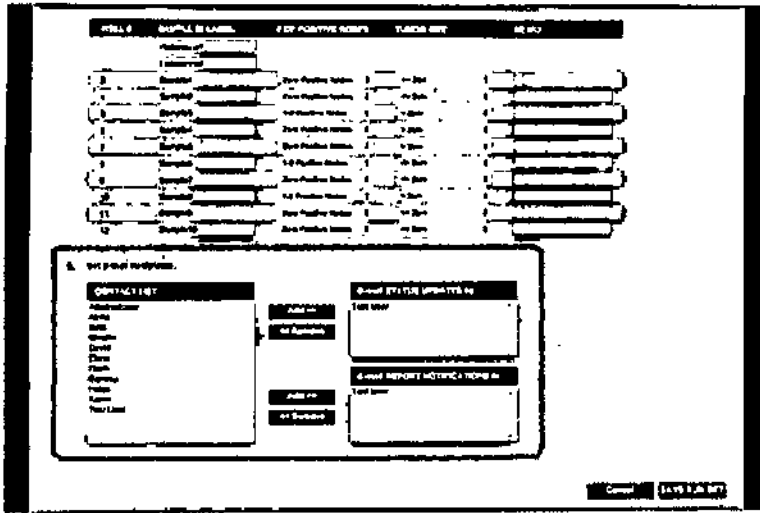


FIGURA 4.20: la ubicación de la lista de contactos y alertas por correo electrónico en el formulario "Create New Run Set" (Crear nueva serie de ciclos)

Es crucial que la información de la muestra se introduzca correctamente. Cada pozo debe completarse con toda la información necesaria antes de introducir la información de la muestra para el siguiente pozo. Una vez introducida toda la información de la serie de ciclos, haga clic en Save Run Set (Guardar serie de ciclos). Una vez guardada la serie de ciclos, se le preguntará si desea imprimir una hoja de cálculo.

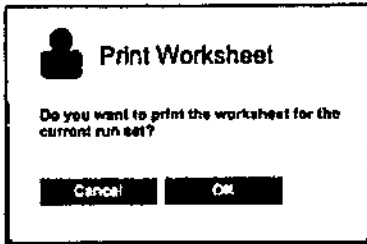


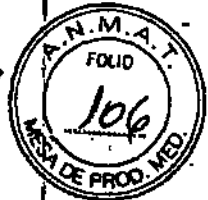
FIGURA 4.21: el mensaje "Print Worksheet" (Imprimir hoja de cálculo)

Seleccione OK (Aceptar) para imprimir la hoja de cálculo de la serie de ciclos.

NOTA: Al hacer clic en el botón Cancel (Cancelar) el usuario se dirigirá a la página Run Sets (Series de ciclos).

NOTA: la serie de ciclos continuará guardada en la aplicación si no se imprime ninguna hoja de cálculo, sin embargo, se recomienda utilizar una hoja de cálculo impresa en el laboratorio cuando se preparen las muestras. La hoja de cálculo también puede imprimirse más tarde

6293



>>> La hoja de cálculo aparecerá en una nueva ventana (FIGURA 4.22).

Run Set ID: 20140812AB		CodeSet Kit Number: 0123450199		
Assay: Prosigna		RNA Isolation Kit Lot:		
Date / Time: 6/12/2014 1:14 PM		Email Status Updates: Test User		
Created By: Test User		Email Report Notifications: Test User		
Well #	Sample ID Label	# of Positive Nodes	Tumor Size	Name
1	Reference1	N/A	N/A	N/A
2	Reference2	N/A	N/A	N/A
3	Sample1	Zero Positive Nodes	<= 20µm	
4	Sample2	Zero Positive Nodes	<= 20µm	
5	Sample3	1-3 Positive Nodes	> 20µm	
6	Sample4	Zero Positive Nodes	> 20µm	
7	Sample5	Zero Positive Nodes	> 20µm	
8	Sample6	1-3 Positive Nodes	<= 20µm	
9	Sample7	Zero Positive Nodes	<= 20µm	
10	Sample8	1-3 Positive Nodes	> 20µm	
11	Sample9	Zero Positive Nodes	<= 20µm	
12	Sample10	Zero Positive Nodes	<= 20µm	

FIGURA 4.22: un ejemplo de hoja de cálculo

Seleccione Print (Imprimir) para imprimir la hoja de cálculo y, a continuación, cierre la hoja de cálculo. La aplicación le llevará a la página Run Sets (Series de ciclos).

### Editar una serie de ciclos

Las series de ciclos con el estado "BatchRegistered" (Lote registrado) pueden editarse. Los usuarios deben editar una serie de ciclos para que coincidan con el registro de hibridación final si la información de la muestra se ha modificado. Por ejemplo, las etiquetas de ID de muestra pueden actualizarse si se intercambian las muestras de los pacientes o si se asigna un nuevo ID de muestra.

Para editar una serie de ciclos, seleccione la serie de ciclos correspondiente en la lista de la página "Run Sets" (Series de ciclos) y haga clic en el botón Edit (Editar) (FIGURA 4.23).

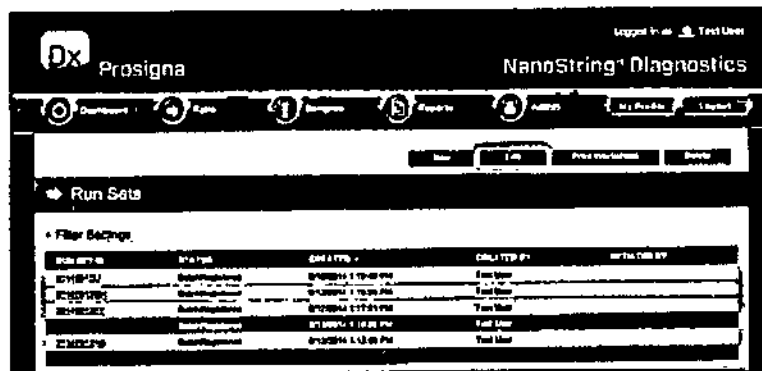


FIGURA 4.23: ubicación del botón Edit (Editar) en la página "Run Sets" (Series de ciclos)

>>> Aparecerá la página "Edit Run Set" (Editar serie de ciclos).

*Handwritten signature/initials*

Dra. SILVIA DANIELA  
DIRECTORA CNICA  
INSTRUMENTOS 421  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apodado  
BIOSYSTEMS S.A.

*Handwritten signature*

6293

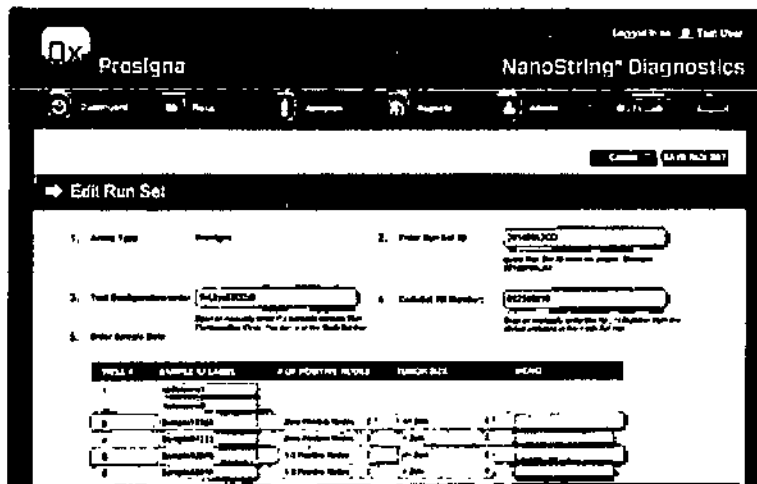


FIGURA 4.24: la página Edit Run Set (Editar serie de ciclos)

**NOTA:** Si hace clic en el hipervínculo Run Set ID (ID de serie de ciclos), NO se abrirá la serie de ciclos para su edición. Si hace clic en el hipervínculo se abrirá la página de estado "Samples" (Muestras), que se habrá filtrado previamente para visualizar únicamente dichas serie de ciclos.

Compruebe que se haya abierto la serie de ciclos correcta y, en continuación, edite la serie de ciclos según corresponda. Guarde los cambios haciendo clic en el botón Save Run Set (Guardar serie de ciclos) situado en la parte superior. Cuando se le solicite, imprima la hoja de cálculo, tal y como se ha recomendado anteriormente en esta sección.

### Eliminar una serie de ciclos

Las series de ciclos con el estado "Batch Registered" (Lote registrado) pueden eliminarse, si fuera necesario. Para eliminar una serie de ciclos, seleccione la serie de ciclos correspondiente en la lista y haga clic en el botón Delete (Eliminar) (FIGURA 4.25).

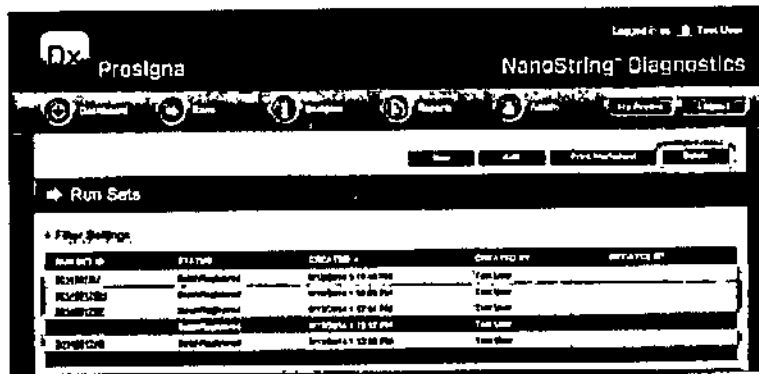


FIGURA 4.25: ubicación del BOTÓN Delete (Eliminar) en la página "Run Sets" (Series de ciclos)

*ff*

>>> Aparecerá un mensaje para confirmar la eliminación de la serie de ciclos.

*[Signature]*

6 29/31

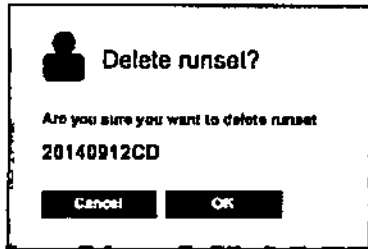


FIGURA 4.26: el mensaje "Delete runset?" (¿Eliminar serie de ciclos?)

Haga clic en OK (Aceptar) para eliminar la serie de ciclos o Cancel (Cancelar) para volver a la página "Run Sets" (Series de ciclos).

### Editing Sample Information (Edición de la información de la muestra)

En ocasiones, es posible que sea necesario volver a generar un informe si uno o más parámetros (p. ej. Prosigna, # of Positive Nodes [N.º de ganglios positivos] y Tumor Size [Tamaño del tumor]) se introdujeron de forma incorrecta. Estos parámetros pueden cambiarse en la página Create/Edit Run Set (Crear/Editar series de ciclos) antes de que la muestra se inicie en la Prep Station (estación de preparación). Sin embargo, una vez que la muestra se haya iniciado en la Prep Station (estación de preparación), el administrador será la única persona que pueda editar estos campos y generar un informe nuevo. Esta acción solo se puede realizar una vez por cada muestra. El informe nuevo se marcará como un informe revisado e incluirá los parámetros y los resultados obsoletos como referencia. Asimismo, si la Prep Station (estación de preparación) o el analizador digital se han iniciado antes de descubrir que los parámetros se han introducido de forma incorrecta, no anula el ciclo; deje que se complete y luego edite los parámetros de la muestra para revisar el ciclo.

**IMPORTANTE:** El usuario debe tener privilegios del administrador para editar una muestra analizada y volver a realizar el informe. Solo se puede realizar una repetición del informe.

Consulte la sección Administrador en Edición de la información de la muestra.

### E. Impresión de hojas de cálculo

Se recomienda encarecidamente el uso de hojas de cálculo al configurar reacciones de hibridación. Tal y como se ha descrito anteriormente, cada vez que se guarda una serie de ciclos, el sistema solicita al usuario que imprima la hoja de cálculo. Sin embargo, también es posible imprimir hojas de cálculo de las series de ciclos en cualquier momento desde la aplicación web nCounter.

Para imprimir una hoja de cálculo de las series de ciclos, diríjase a la página "Run Sets" (Series de ciclos), seleccione la correspondiente fila Run Set (Serie de ciclos) y haga clic en el botón Print Worksheet (Imprimir hoja de cálculo) (FIGURA 4.27).

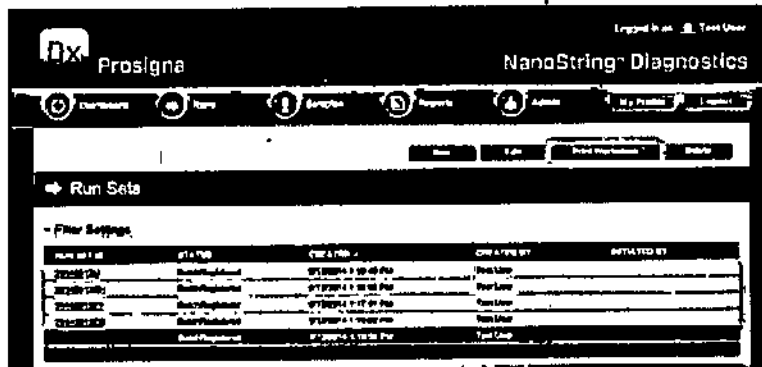


FIGURA 4.27: ubicación del botón Print Worksheet (Imprimir hoja de cálculo) en la página "Run Sets" (Series de ciclos)

>>> La hoja de cálculo aparecerá en una nueva ventana.

6293



Well #	Sample ID Label	# of Positive Nodes	Turner Ratio	Merms
1	Reference1	0	N/A	N/A
2	Reference2	0	N/A	N/A
3	Sample14376	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
4	Sample14378	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
5	Sample14382	1.5 Positive Nodes	0.00	0.00
6	Sample17731	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
7	Sample15864	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
8	Sample17702	1.5 Positive Nodes	0.00	0.00
9	Sample17360	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
10	Sample17360	1.5 Positive Nodes	0.00	0.00
11	Sample11508	Zero Positive Nodes	0.00	0.00
12	Sample12410	Zero Positive Nodes	0.00	0.00

FIGURA 4.26: un ejemplo de hoja de cálculo

Pulse el botón Print (Imprimir) para comenzar con el proceso de impresión de la hoja de cálculo o el botón Close (Cerrar) para cerrar la ventana.

### F. Informes

Los usuarios con el privilegio de "Access Diagnostic Reports" (Acceso a Informes de diagnóstico) pueden seleccionar y descargar los informes de diagnóstico desde la página Reports (Informes).

Los usuarios que se seleccionaron para recibir notificaciones de informes al establecer la serie de ciclos deberían recibir una notificación por correo electrónico en la que se les informe de que el procesamiento de la muestra ha finalizado y de que el informe está disponible para su descarga. En la notificación por correo electrónico se incluirá un enlace para descargar informes de la aplicación web.

**NOTA:** Para utilizar el enlace de descarga y acceder a los informes de diagnóstico, el usuario tendrá que iniciar sesión en la aplicación web Counter.

En la página Reports (Informes), seleccione la(s) fila(s) de las muestras que desea descargar y haga clic en el botón Download (Descargar) (FIGURA 4.29).

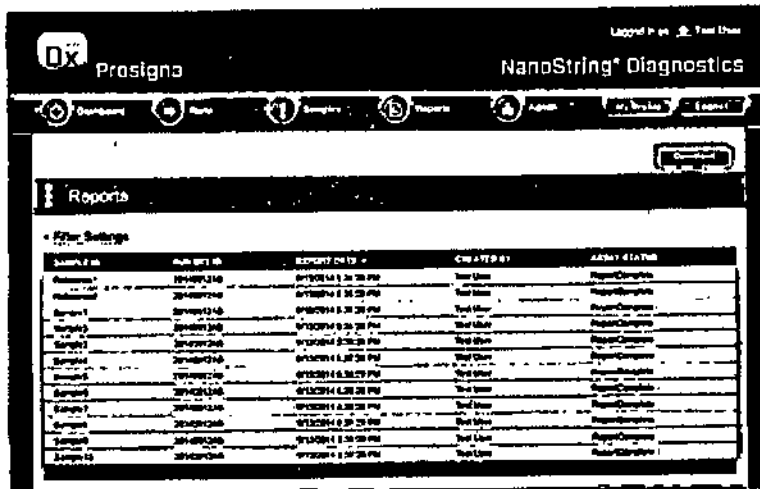


FIGURA 4.29: la página "Reports" (Informes)

Los informes se comprimirán en un archivo ZIP (\*.zip). Este archivo puede abrirse inmediatamente o puede guardarse en una ubicación determinada de su equipo o red.

**NOTA:** Recuerde que los informes contienen información confidencial. Tenga cuidado cuando guarde en redes o ubicaciones a las que puedan acceder otras personas.

nanoString  
 2016-01 MAN-10008-03  
 Dra. SANDRA ZANELA  
 DIB. EN ORA TECNICA  
 INT. 1.421  
 BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
 BioSystems S.A.

629



### G. Administración

Para aquellos usuarios a los que se les ha asignado la función Administrativa (Administrativa), el botón Admin está disponible en la barra de menús superior de la aplicación web. Los administradores pueden elegir una de estas funciones:

- Manage Users (Gestionar usuarios)
- System Settings (Configuración del sistema)
- Add User (Añadir usuario)
- Configure Report (Configurar Informe)

Además de las funciones que aparecen en el menú Admin, hay dos zonas adicionales a las que solo pueden acceder los usuarios administradores:

- LIS Integration (Integración LIS)
- Editing Sample Information (Edición de la información de la muestra)

### Añadir, eliminar y gestionar usuarios

Para añadir un nuevo usuario, seleccione Admin de la barra de menús superior y haga clic en Add User (Añadir usuario).

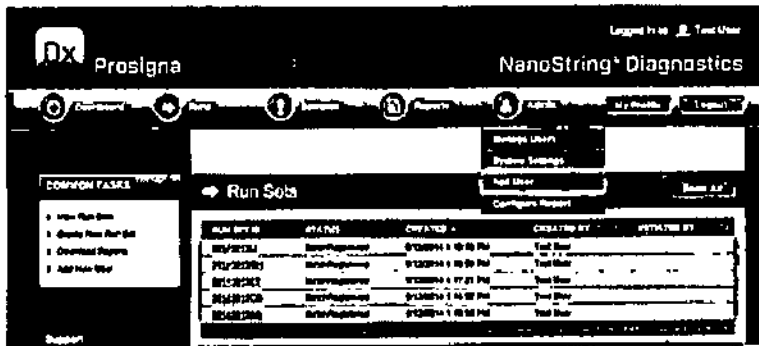


FIGURA 4.30: la ubicación del botón Add User (Añadir usuario) del submenú Admin.

>>> Aparecerá el formulario "Add New User" (Añadir nuevo usuario).

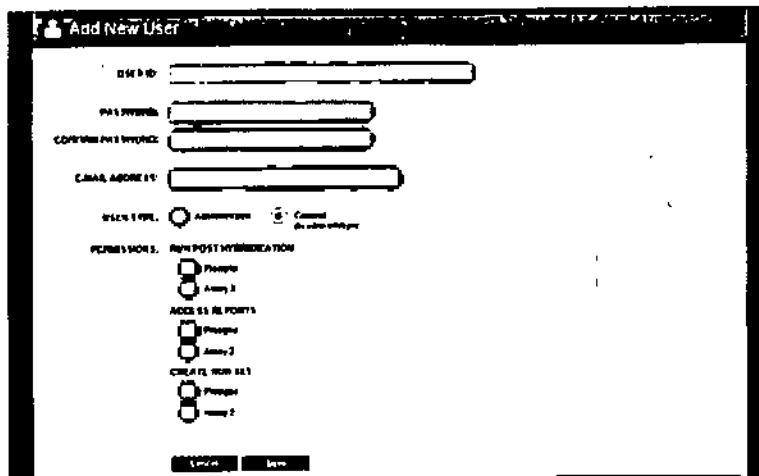


FIGURA 4.31: el formulario "Add New User" (Añadir nuevo usuario)

Dra. SILVIA ZARZUELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
421  
BIOSYSTEMS S.A.

Un Alejandro Díez  
Asesorado  
BioSystems S.A.

6293



Introduzca la siguiente información y haga clic en el botón Save (Guardar).

- User ID (ID de usuario) (campo obligatorio)
- Password (Contraseña) (campo obligatorio)
- Confirm password (Confirmar contraseña) (campo obligatorio)
- E-mail address (Dirección de correo electrónico) (campo obligatorio)
- User type (Tipo de usuario) (campo obligatorio). Puede elegir entre:
  - General (General). Acceso a funciones estándar, como por ejemplo, cómo crear una serie de ciclos (el acceso no incluye el procesamiento de muestras)
  - Administrator (Administrador). Acceso de usuarios generales, además de acceso administrativo, incluyendo la gestión de usuarios y la configuración del sistema
  - Permissions (Permisos) (se requiere al menos un permiso). Elija todas las opciones que correspondan:
    - Run Post Hybridization (Ejecutar poshibridación). Este permiso es necesario para utilizar la Prep Station (estación de preparación) e iniciar el proceso de poshibridación para la(s) prueba(s) seleccionada(s)
    - Access Reports (Acceder a informes). Este permiso es necesario para ver la ficha Reports (Informes) de la aplicación web y descargar informes de diagnóstico de la(s) prueba(s) seleccionada(s)
    - Create Run Set (Crear serie de ciclos). Este permiso es necesario para crear una nueva serie de ciclos o editar una serie de ciclos existente en la aplicación web para la(s) prueba(s) seleccionada(s)

**NOTA:** Los administradores no cuentan automáticamente con el permiso para acceder a los Informes de diagnóstico e iniciar un procesamiento de poshibridación en la Prep Station (estación de preparación); el permiso debe aún asignarse. Los administradores pueden asignar permisos a sus propias cuentas.

**NOTA:** Puede asignarse una configuración de permisos única para cada tipo de prueba disponible en el sistema. Por ejemplo, un usuario puede tener permiso para crear una serie de ciclos en todas las pruebas del sistema y para iniciar la poshibridación en una sola prueba, y no tener permiso para acceder a ningún informe.

La función Manage Users (Gestionar usuarios) permite a un administrador editar o eliminar usuarios. Para gestionar los usuarios existentes, seleccione la opción Admin en la barra de menús situada en la parte superior de la página y haga clic en Manage Users (Gestionar usuarios).

>>> Aparecerá la pantalla "Manage Users" (Gestionar usuarios).

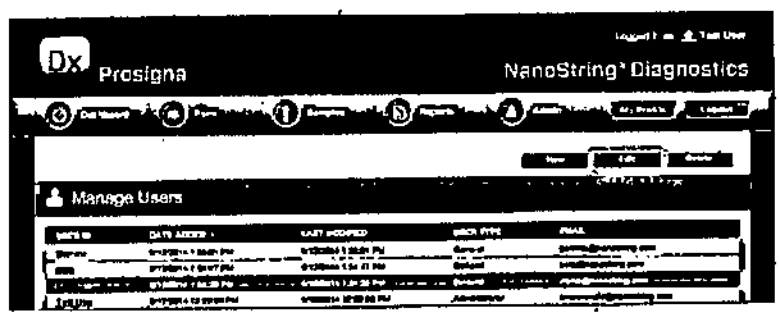


FIGURA 4.32: la página "Manage Users" (Gestionar usuarios) y la ubicación del botón Edit (Editar).



Dra. SINDY ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIGSYS/EMS S.A.

2016-01 MAN-10008-03

Lic. Alejandro Diez  
Operador  
BIGsystems S.A.



629/3



Para editar un usuario, seleccione el enlace User ID (ID de usuario) o seleccione la fila del usuario especificado y haga clic en el botón Edit (Editar).

>>> Aparecerá el formulario "Edit User Data" (Editar datos del usuario).

FIGURA 4.33: el formulario "Edit User Data" (Editar datos del usuario)

Edite la siguiente información y haga clic en el botón Save (Guardar) para guardar los cambios realizados.

- User ID (ID de usuario)
- Password (Contraseña)
- Confirm Password (Confirmar contraseña)
- E-mail Address (Dirección de correo electrónico)
- User Type (Tipo de usuario)
- Assign Permissions (Permisos de pruebas)
  - Run Post Hybridization (Ejecutar poshibridación)
  - Access Reports (Acceder a Informes)
  - Create Run Set (Crear serie de ciclos)

Para eliminar un usuario, abra la página "Manage Users" (Gestionar usuarios), seleccione la fila del correspondiente usuario y haga clic en el botón Delete (Eliminar) (FIGURA 4.34).

User ID	DATE ADDED	LAST MODIFIED	USER TYPE	EMAIL	ACTIONS
Admin	2/20/2014 12:28:51 PM	2/20/2014 12:28:51 PM	Administrator	admin@nanosting.com	View Edit Delete
John	2/20/2014 12:28:51 PM	2/20/2014 12:28:51 PM	General	john@nanosting.com	View Edit Delete
Test User	2/20/2014 12:28:51 PM	2/20/2014 12:28:51 PM	General	test@nanosting.com	View Edit Delete

FIGURA 4.34: ubicación del botón Delete (Eliminar) en la página "Manage Users" (Gestionar usuarios)

>>> Aparecerá un mensaje de confirmación.

6293

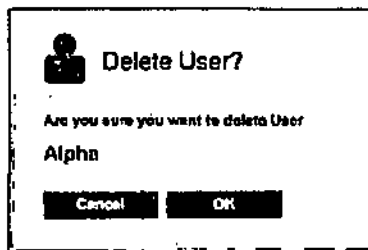


FIGURA 4.35: el mensaje "Delete User?" (¿Eliminar usuario?)

Haga clic en OK (Aceptar) para eliminar el usuario o Cancel (Cancelar) para volver a la página "Manage Users" (Gestionar usuarios).

### System Settings (Configuración del sistema)

Aquellos usuarios con el tipo de usuario administrador tienen acceso a la opción System Settings (Configuración del sistema). Existen cuatro funciones principales dentro de la página "System Settings" (Configuración del sistema):

- Date and Time (Fecha y hora)
- E-mail Settings (Configuración de correo electrónico)
- SSH Settings (Configuración de SSH)
- IP Address (Dirección IP)

Para acceder a la página "System Settings" (Configuración del sistema), seleccione la opción Admin de la barra de menús superior y seleccione System Settings (Configuración del sistema) (FIGURA 4.36).

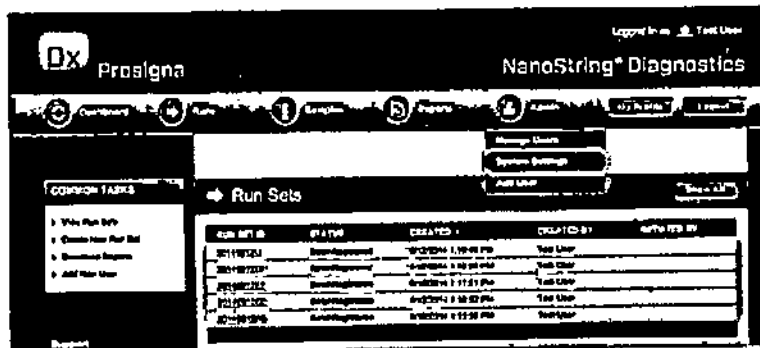


FIGURA 4.36: ubicación de la OPCIÓN System Settings (Configuración del sistema) del submenú Admin.

>>> Aparecerá la página "System Settings" (Configuración del sistema) (FIGURA 4.37).

Las cuatro funciones descritas anteriormente se organizan en distintas fichas. La ficha predeterminada es "Date and Time" (Fecha y hora).

### Date and Time (Fecha y hora)

La configuración de Date and time (Fecha y hora) la establece inicialmente el personal de NanoString durante el proceso de configuración del sistema nCounter. Cambio esta configuración únicamente cuando sea realmente necesario. Haga clic en Save (Guardar) para guardar los cambios o en Cancel (Cancelar) para descartar los cambios y realizar otra función.

B



Dra. S. ZANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
AS 1.421  
2016-01 MAN 16008-03

Lic. Alejandro Diez  
Ingeniero  
BioSystems S.A.

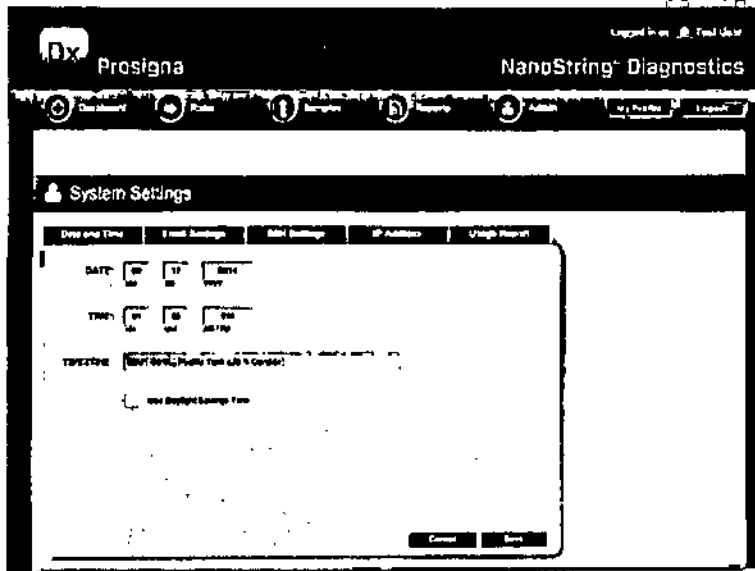


FIGURA 4.37: la ficha "Date and Time" (Fecha y hora) de la página "System Settings" (Configuración del sistema)



NOTA: Los administradores no pueden ajustar las opciones Time Zone (Zona horaria) ni Daylight Saving Time (Horario de verano). Póngase en contacto con el Servicio técnico de NanoString en el caso de que estos valores deban ajustarse.



NOTA: Si cambia los valores de la fecha y/o la hora en la aplicación web nCounter, también se cambiarán en el analizador digital y la Prep Station (estación de preparación). Tenga cuidado al realizar cambios en estos valores.

### E-mail Settings (Configuración de correo electrónico)

La configuración de correo electrónico debe realizarse para que el sistema nCounter pueda enviar correos electrónicos automatizados sobre actualizaciones de estado, como la finalización del ciclo de la Prep Station (estación de preparación) o notificaciones de informes de diagnóstico.

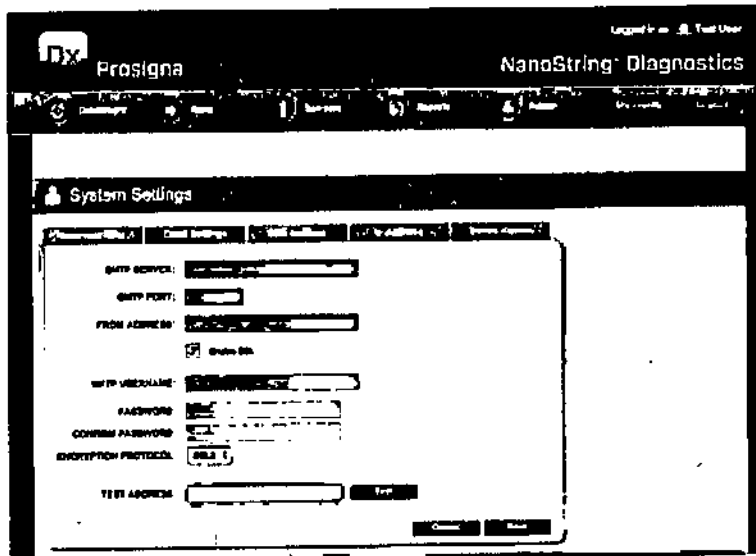


FIGURA 4.38: la ficha "E-mail Settings" (Configuración de correo electrónico)

6293



Los siguientes campos están disponibles:

- SMTP Server (Servidor SMTP) (campo obligatorio) (Protocolo simple de transferencia de correo): nombre del servidor de correo electrónico
- SMTP Port (Puerto SMTP) (campo obligatorio): puerto utilizado para el servidor de correo electrónico
- SMTP Address (Dirección SMTP) (campo obligatorio): dirección desde la que se envían los correos electrónicos automatizados
- Enable SSL (Habilitar SSL): comprobar si se está utilizando un servidor de correo electrónico seguro
- SMTP Username (Nombre de usuario SMTP): nombre de la cuenta del servidor de correo electrónico seguro (campo obligatorio, si la opción Enable SSL (Habilitar SSL) está activada)
- Password (Contraseña): contraseña para SMTP username (Nombre de usuario SMTP) (campo obligatorio, si la opción Enable SSL (Habilitar SSL) está activada)
- Confirm password (Confirmar contraseña): la misma contraseña que la anterior (campo obligatorio, si la opción Enable SSL (Habilitar SSL) está activada)
- Encryption Protocol (Protocolo de cifrado): estas opciones cifran de forma eficaz los datos de correos electrónicos enviados por Internet entre el cliente y el servidor de correo electrónico. A continuación, se indican posibles valores para el protocolo de cifrado (selección obligatoria, si la opción Enable SSL (Habilitar SSL) está activada):
  - SSL3 (Secure Socket Layer) (Capa de sockets seguros): protocolo de cifrado ampliamente utilizado
  - TLS (Transport Layer Security) (Seguridad de la capa de transporte): protocolo de cifrado más seguro que SSL
- Test Address (Dirección de prueba) (campo opcional): se puede utilizar para probar si la configuración del correo electrónico se ha realizado correctamente. Introduzca una dirección de correo electrónico a la que tenga acceso y pulse el botón Test (Probar). Compruebe su cuenta de correo electrónico para confirmar que la configuración funciona y que el correo electrónico de prueba se ha recibido.

### SSH Settings (Configuración de SSH)

La ficha "SSH Settings" (Configuración de SSH) permite a un administrador configurar el servidor Secure Shell (servidor SSH). El servidor SSH permite a los usuarios extraer mediante programación datos de informes nCounter del sistema de forma segura. También permite conexiones limitadas de clientes de forma simultánea. Consulte la sección "Integración LIS" para obtener más información.

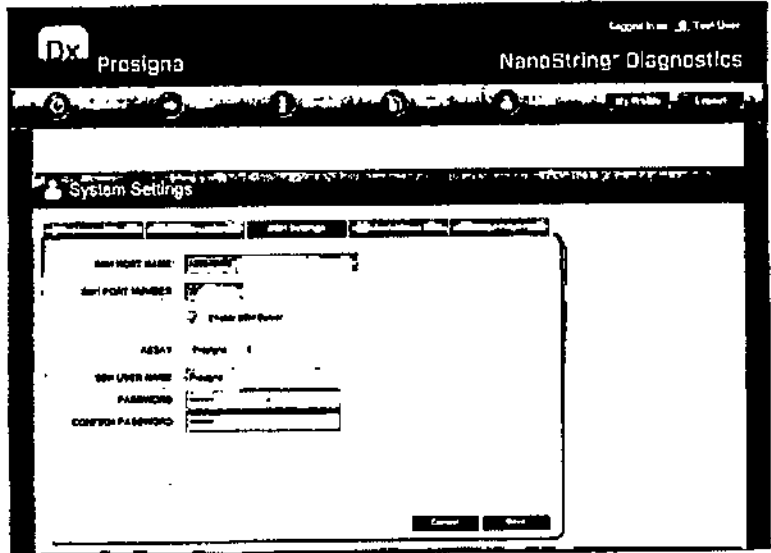


FIGURA 4.39: la ficha "SSH Settings" (Configuración de SSH)



Dr. SILVIA CANELA  
2016-01-14-21  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Propaganda  
BioSystems S.A.

51

Los siguientes campos están disponibles:

**Campos preconfigurados**

- **SSH host name** (Nombre de host SSH): el nombre del host utilizado por el cliente para conectarse al servidor SSH
- **SSH port number** (Número de puerto SSH): el puerto utilizado por el cliente para conectarse al servidor SSH
- **SSH user name** (Nombre de usuario SSH): nombre de cuenta del servidor SSH utilizado por el cliente para autenticar la conexión

**Campos configurables**

- **Enable SSH server** (Habilitar servidor SSH): casilla de verificación para habilitar o deshabilitar el servidor SSH
- **Password** (Contraseña): contraseña de la cuenta del servidor SSH utilizada por el cliente para autenticar la conexión (campo obligatorio si la opción "Enable SSH server" (Habilitar servidor SSH) está activada)
- **Confirm password** (Confirmar contraseña): la misma contraseña introducida anteriormente (campo obligatorio, si la opción Enable SSH (Habilitar SSH) está activada)

**IP Address (Dirección IP)**

La función IP Address (Dirección IP) es una función esencial para habilitar la conexión de los Instrumentos. La Prep Station (estación de preparación), el analizador digital y la aplicación web nCounter están en constante comunicación. La dirección IP es la base para configurar dicha comunicación. Tenga cuidado al realizar cambios en la configuración de "IP Address" (Dirección IP).

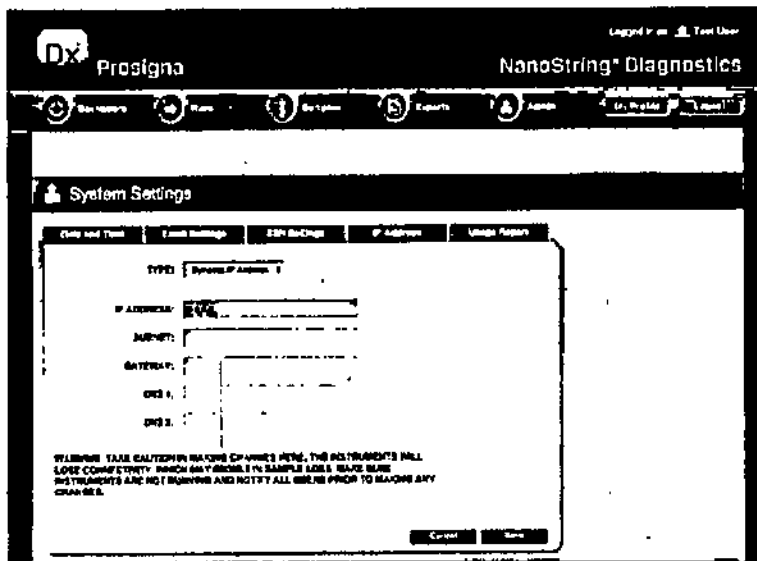


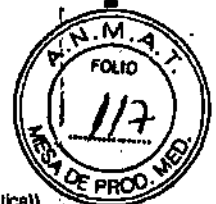
FIGURA 4.40: la ficha "IP Address" (Dirección IP)

Los siguientes campos están disponibles:

- **Typo (Tipo):** puede elegir entre las siguientes opciones:
  - **Static IP address** (Dirección IP estática): esta opción requiere que el administrador de red establezca una dirección que nunca se cambiará.
  - **Dynamic IP address** (Dirección IP dinámica) (predeterminada): conocida como DHCP, esta opción permite a la red local buscar y asignar automáticamente una dirección IP. Se pueden realizar cambios en esta dirección.
- **IP Address** (Dirección IP): la dirección IP facilitada por el administrador de red para la opción Static IP address (Dirección IP estática)
- **Subnet** (Subred): la subred facilitada por el administrador de red (para la opción Static IP address (Dirección IP estática))
- **Gateway** (Puerta de enlace): la dirección de puerta de enlace facilitada por el administrador de red (para la opción Static IP address (Dirección IP estática))

IP

0203



- DNS 1: servidor de nombres de dominio facilitado por el administrador de red (para la opción Static IP address (Dirección IP estática))
- DNS 2: un segundo DNS facilitado de forma opcional por el administrador de red y utilizado como una copia de seguridad (para la opción Static IP address (Dirección IP estática))



NOTA: La opción Static IP Address (Dirección IP estática) es especialmente útil, ya que garantiza una comunicación más fiable entre el analizador digital y la Prep Station (estación de preparación). Si la opción Dynamic IP Address (Dirección IP dinámica) está seleccionada, el analizador digital puede a veces adquirir una dirección IP distinta, lo que puede provocar problemas de comunicación intermitente.

### Configure Report (Configurar informe)

En muchos casos, las organizaciones tienen formatos estandarizados comunes para todos los informes de diagnóstico que producen. El sistema permite a los administradores personalizar el encabezado y el pie de página del informe y, de forma opcional, permite añadir una línea de firma en la última página. Los administradores pueden definir texto estático e incluir información sobre la muestra proporcionada por el sistema. Los parámetros de las muestras que se encuentren en el encabezado del informe de diagnóstico estándar de NanoString pueden incluirse en encabezados y pies de página personalizados. Además, los administradores pueden definir los campos que se cumplimentarán en el PDF resultante, tras la descarga del sistema de análisis nCounter Dx. Estos campos pueden usarse para el nombre del paciente, su fecha de nacimiento u otra información personal identificable deseada. (Los usuarios deberán guardar los formularios cumplimentados aparte del sistema nCounter, pues no está diseñado para ser compatible con el almacenamiento de información personal identificable). El cuerpo del informe, incluido los resultados de la prueba, los logos y los gráficos explicativos no deberían modificarse.

Cada prueba instalada y localizada está personalizada de forma independiente. El administrador solo debería hacer cambios en la prueba seleccionada al iniciar sesión, aunque puede personalizar el lugar de cualquier informe instalado para esa prueba. Los cambios se hacen primero en un borrador del informe. Cuando el borrador cumple los requisitos de la organización, el administrador puede mover el borrador a la producción. Los administradores también pueden crear un borrador nuevo del informe de producción en curso, a partir de varias plantillas proporcionadas por el sistema o con encabezado, pie de página y zona de firma en blanco.

Para acceder a la página "Configure Report" (Configurar Informe), seleccione la opción Admin de la barra de menús superior y seleccione Configure Report (Configurar Informe) (FIGURA 4.41).

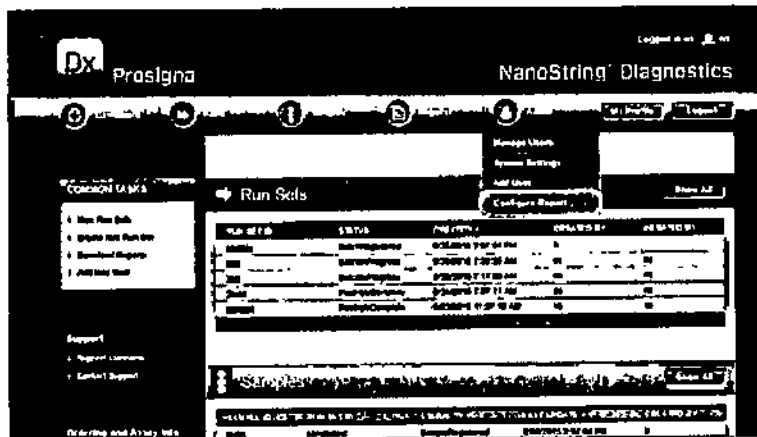
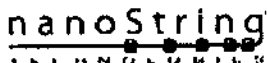


FIGURA 4.41: ubicación de la OPCIÓN Configure Report (Configurar informe) del menú Admin.

*Handwritten signature/initials*

Dra. SILVIA CANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
14 421  
nCounter SYSTEMS S.A.

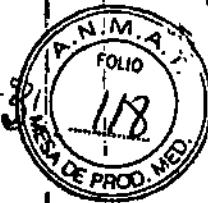
Lic. Alejandro Díez  
Coordinador  
nCounter SYSTEMS S.A.



2016-01 MAN-10008-03

*Handwritten signature*

629



La página "Configure Report" (Configurar informe) aparecerá y se abrirá de forma predeterminada con la pestaña "General" (General) (FIGURA 4.42). En esta zona hay las siguientes pestañas:

- General(General)
- Header(Encabezado)
- Footer (Pie de página)
- Firma

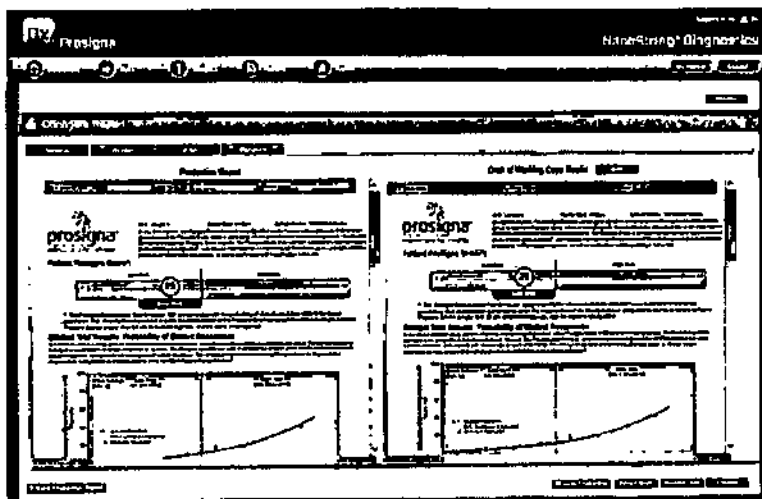


FIGURA 4.42: la pestaña General (General) de la página Configuro Report (Configurar Informe). (El contenido de los informes varía según las aprobaciones normativas).

Además de la página General (General), la página Configure Report (Configurar Informe) tiene una serie de pestañas, como Header (Encabezado), Footer (Pie de página) o Signature (Firma), para personalizar partes individuales del Informe.

La pestaña General (General) tiene un botón de "Preview" (Previsualización) (común para todas las pestañas) y una serie de botones para elegir y controlar la producción y los borradores de los informes:

- Discard Production Report (Descartar Informe de producción): Si selecciona este botón, se eliminará toda la personalización de los informes generada por el usuario. Los ajustes se restablecerán a los informes de pacientes de sistema de análisis nCounter Dx.
- Move to Production (Mover a la producción): Con esta opción se mueve el borrador del informe a la producción. Esto elimina el informe de producción actual. Esta acción no se puede deshacer.
- Revert Draft (Revertir borrador): Este botón devuelve todas las partes del borrador del informe (si se ha configurado, encabezado, pie de página y firma) al estado en el que se encontraban al comienzo de la sesión de edición actual.
- Discard Draft (Descartar borrador): Elimina la personalización del encabezado, el pie de página y la firma.
- Preview (Previsualización): Tiene una funcionalidad idéntica a la de "Preview" (Previsualización) en la parte superior de la página; muestra una previsualización en PDF a página completa del borrador del informe actual.
- Edit (Editar): Abre el editor del encabezado para permitir a los usuarios administrativos personalizar sus informes.

Si no hay un borrador en curso (véase FIGURA 4.43) se mostrará una lista desplegable de plantillas disponibles en lugar de una miniatura de un borrador del informe, junto con un control para iniciar un nuevo borrador. Los borradores pueden iniciarse a partir del informe de producción actual, del encabezado y el pie de página estándar de NanoString, de un encabezado y pie de página en blanco o de una de las plantillas suministradas. Estas plantillas tienen como objetivo que los administradores las modifiquen con posterioridad para satisfacer las necesidades de sus organizaciones.

JP

Dra. SILVANA KUPKA  
DIRECTORA TECNICA  
NANOSTRING S.A.  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Ricardo Diez  
Gerente  
BioSystems S.A.

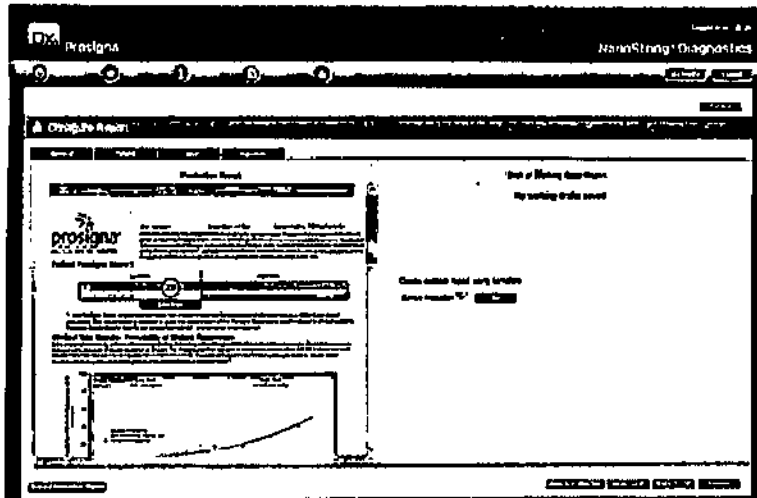


FIGURA 4.43: la pestaña General (General) de la página Configure Report (Configurar Informe), muestra el menú para iniciar un nuevo borrador. (El contenido de los informes varía según las aprobaciones normativas).

### Pestaña Header (Encabezado)

La pestaña "Header" (Encabezado) permite a los administradores modificar el encabezado del informe (véase FIGURA 4.44).

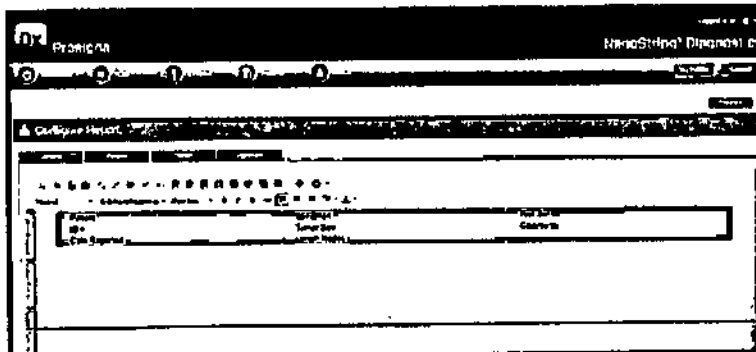


FIGURA 4.44: la pestaña Header (Encabezado), de la página Configure Report (Configurar Informe), muestra el encabezado predeterminado de NanoString.

El cuerpo principal de la pestaña Header (Encabezado) es una zona de introducción de texto para especificar el contenido y diseño del encabezado personalizado del informe. Hay una regla vertical para ayudar en la colocación de elementos de contenido. La línea roja representa el tamaño máximo del encabezado. Todo el contenido situado por debajo de esta línea quedará oculto por el cuerpo del informe y no será visible. El cuerpo del informe comenzará inmediatamente después del encabezado; a menos que el encabezado personalizado incluya explícitamente líneas en blanco, no habrá un espacio visible entre el contenido generado por el usuario del encabezado y el cuerpo del informe de NanoString. El botón Preview (Previsualización) puede usarse en todo momento para generar un PDF en el que aparecerán los campos del encabezado que ya se hayan completado.

En la zona superior de introducción de texto, dispone de herramientas de edición predeterminadas (FIGURA 4.45), lo que le permite introducir texto y darle formato a nivel de carácter y de párrafo, así como importar imágenes, usar tablas para colocar el contenido de una forma más precisa e insertar campos especiales.

*JP*



6293

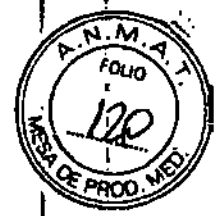


FIGURA 4.45: Herramientas de formato

Cuando seleccione el icono '+', se activa un menú (FIGURA 4.46) de campos especiales que podrá introducir, dar formato y colocar en el informe según necesite. Estos campos son:

- PDF Field (Campo PDF): En el PDF resultante, son campos en blanco que el usuario puede complementar con visores PDF (como Adobe Reader, Apple OS X Preview, etc.). Estos campos pueden usarse para introducir cualquier información deseada sobre la muestra, incluida la información personal identificable amparada por la ley de Transferencia y Responsabilidad de Seguro Médico, como el nombre del paciente o su fecha de nacimiento. El PDF editado deberá descargarse y guardarse para preservar el contenido introducido por el usuario.
- Run Set Status ID (ID de la serie de ciclos): La ID de la serie de ciclos introducida en la página Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos).
- Sample ID (ID de Muestra): La ID de muestra introducida en la página Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos).
- Run Date (Fecha del ciclo): La fecha del ciclo de la muestra en el analizador digital. El sistema de análisis nCounter Dx registra esta fecha automáticamente.
- Comments (Comentario): El memorando introducido con la muestra en la página Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos).
- Los campos restantes son parámetros específicos de las pruebas (p. ej. Tumor Size [Tamaño del tumor] y Node Count [Cuenta de los ganglios]). Es posible que su prueba específica no tenga parámetros introducidos por el usuario.

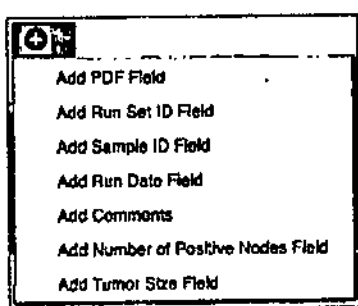


FIGURA 4.46: El menú de parámetros especiales, que muestra campos específicos de la prueba de ejemplo.

NOTA: Tras la colocación inicial, las imágenes y las tablas pueden personalizarse o ajustarse mediante la modificación de ciertas propiedades. Puede acceder a estas propiedades haciendo clic con el botón derecho del ratón (o si tiene un sistema sin un ratón con botón derecho, haciendo clic y pulsando control) en el objeto y seleccionando los elementos correspondientes del menú presentado.

En la parte inferior de la zona de introducción del texto, hay un par de controles (FIGURA 4.47) que permiten a los usuarios avanzados usar el modo de diseño interactivo por defecto o editar directamente el HTML subyacente. Los usuarios avanzados pueden usar el editor HTML para ajustar diseños o aplicar efectos que no se encuentran disponibles directamente en el modo de diseño interactivo.

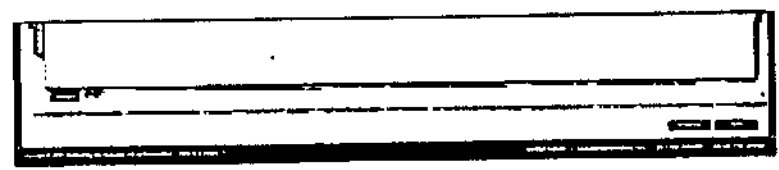


FIGURA 4.47 Controles interiores de la pestaña Header (Encabezado).

El botón Preview (Previsualización) en la parte inferior de la página desempeña una función idéntica que la del botón Preview (Previsualización) en la parte superior de la página. El botón Next (Siguiente) proporciona una forma sencilla de navegación entre pestañas cuando se introduzca un

Dra. SILVIA... LA DIRECTORA TECNICA... BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez... Biosystems S.A.

6293



Informe personalizado inicialmente. Asimismo, los usuarios pueden seleccionar directamente la pestaña que deseen editar.

### Pestaña Footer (Pie de página)

La pestaña "Footer" (Pie de página) (FIGURA 4.48), permite a los administradores modificar el pie de página del Informe. El pie de página siempre se añade en la parte inferior de cada página y se deja un espacio en blanco entre el final del cuerpo y el comienzo del pie. Los controles de formato disponibles para el encabezado también están disponibles para su uso en la zona del pie de página.

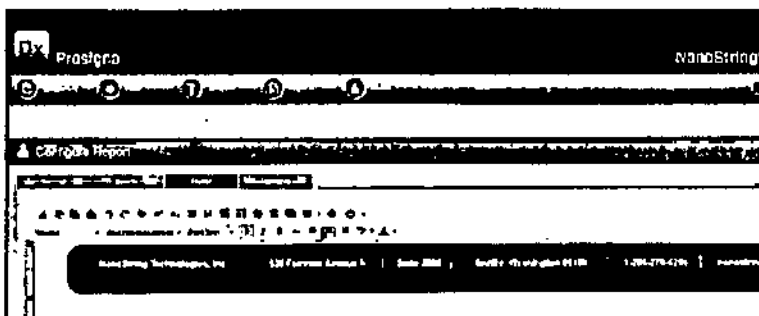


FIGURA 4.48: El pie de página predeterminado de NanoString.

### Pestaña Signature (Firma)

La pestaña "Signature" (Firma) permite a un administrador incluir, de forma opcional, una línea de firma en la última página del informe (FIGURA 4.49). Cuando la casilla de verificación se haya activado, la línea de firma puede editarse. Esta se incluirá en los archivos PDF generados. Las herramientas de edición disponibles para el encabezado también están disponibles para su uso en la firma.

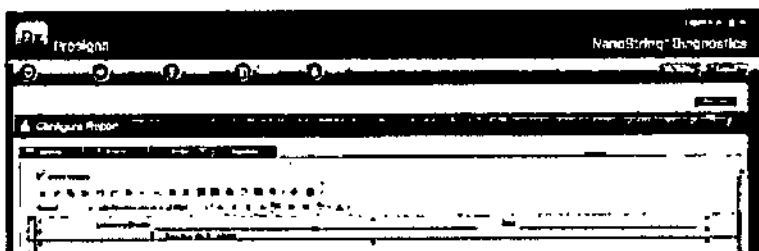


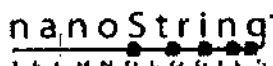
FIGURA 4.49: La pestaña Signature (Firma) con la casilla de verificación activada.

### Ejemplo de configuración del encabezado

Para ilustrar el modo de configuración del encabezado, piense en el caso de un laboratorio con un encabezado estándar, compuesto por el logo de la organización, el apellido del paciente, el nombre de pila, la fecha de nacimiento, el sexo y los campos específicos de la prueba. Este encabezado (FIGURA 4.50), personalizado para la prueba Prosigna, puede implementarse mediante la combinación y anidación de diversos elementos y el ajuste de sus configuraciones individuales. Los campos proporcionados por el sistema se usarán cuando estén disponibles y los campos PDF se usarán para la información personal identificable de este encabezado.

<b>nanostRING</b> 530 Fairview Ave N, Suite 2000 Seattle, WA 98109 Tel: 206-378-6286	Family Name	[ ]	Given Name	[ ]
	DOB	[ ]	Gender	[ ]
	Run Set ID	Batch 95	Node Status	1-3 Positive Nodes
	Run Date		Tumor Size	cm 2cm
	Comments			

FIGURA 4.50: ejemplo de encabezado.



Dr. S. VIZANELA  
2015-01-14 10:00:03  
421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Acordero  
BioSystems S.A.

6293



Los pasos específicos para crear este encabezado son los siguientes:

1. Abra la herramienta de configuración del informe con **Configure Report** (Configurar informe) en el menú **Admin**.
2. Si no hay un borrador en curso, diríjase al paso 4.
3. Si hay un borrador en curso, seleccione el botón **Discard Draft** (Descartar borrador) en la parte inferior derecha de la página. Esto eliminará el borrador en curso. Esta acción no podrá deshacerse. Seleccione **OK** (Aceptar) para confirmar que desea eliminar el borrador.
4. Cree un informe personalizado. Para este ejemplo, elija la plantilla **Blank** (En blanco), seleccione **Go** (Ir).
5. Cuando cree el nuevo borrador, seleccione la pestaña **Header** (Encabezado) para editar el encabezado.
6. Haga clic en la zona de contenido para empezar a editar.
7. Seleccione la herramienta de tabla para crear una nueva tabla.
8. En el cuadro de diálogo "Insert Table..." (Insertar tabla) seleccione la siguiente opción y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar) cuando se hayan introducido todos los parámetros:
  - a. 5 columnas
  - b. 5 filas
  - c. Ancho: Personalizado, 90 %
  - d. Color del borde: cuarta entrada de en la tercera fila, "#339966"
  - e. Tamaño del borde, 2
9. Asegúrese de que el cursor se encuentra en la celda superior izquierda de la tabla que acaba de crearse.
10. Seleccione la herramienta de imagen para **Importar una imagen**.
11. En el cuadro de diálogo "Insert Image" (Insertar imagen), seleccione la siguiente opción y, a continuación, seleccione **Insert** (Insertar) cuando se hayan introducido todos los parámetros:
  - a. Como origen, seleccione "From your computer" (Desde su equipo)
  - b. Seleccione "Browse..." (Examinar), a continuación, examine la imagen que desea utilizar como su logotipo.
12. Una vez insertada la imagen, haga clic con el botón derecho y seleccione **Change Image...** (Cambiar imagen). En el cuadro de diálogo "Change Image" (Cambiar imagen) que está abierto, marque la casilla **More options** (Más opciones) para activar el ajuste preciso de los parámetros de visualización de imágenes.
  - a. Ajuste **Size** (Tamaño): en "Custom Size" (Tamaño personalizado).
  - b. Establece el ancho y la altura, por ejemplo para que el ancho sea inferior a 250 píxeles y la altura menor de 300 píxeles. Los valores exactos dependerán de la altura y el ancho relativos de la imagen que haya seleccionado.
  - c. Establezca la **Position** (Posición): en "Left-aligned" (Alineado a la izquierda).
  - d. Seleccione **Change** (Cambiar) para aplicar estos cambios.
13. Haga clic con el botón derecho sobre el logotipo, a continuación, seleccione **Merge Down** (Combinar hacia abajo) desde el menú que aparece. De esta forma se combinarán las dos celdas primeras de la columna más a la izquierda de la tabla. Repita esta acción hasta que solo haya una celda en la columna más a la izquierda de la tabla.
14. Introduzca la dirección o cualquier texto adicional a continuación, de la imagen.
15. Haga clic en la celda superior de la segunda columna.
16. Introduzca la etiqueta de texto deseada, "Family Name" (Apellidos) y seleccione el icono para alinear el texto a la derecha.
17. Haga clic en la segunda celda de la segunda columna, a continuación, introduzca "DOB" (Fecha de nacimiento) y alinee a la derecha.
18. Haga clic en la tercera celda de la segunda columna, a continuación, introduzca "Run Set ID" (ID de serie de ciclos) y alinee a la derecha.
19. Haga clic en la cuarta celda de la segunda columna, a continuación, introduzca "Run Date" (Fecha del ciclo) y alinee a la derecha.
20. Haga clic en la última celda de la segunda columna, a continuación, introduzca "Comments" (Comentarios) y alinee a la derecha.
21. Haga clic en la primera celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Add PDF Field** (Añadir campo PDF) desde el menú +.

Dra. SILVANA LAURELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BIOSYSTEMS S.A.

6293



22. Haga clic en la segunda celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Add PDF Field** (Añadir campo PDF) desde el menú +.
23. Haga clic en la tercera celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Add Run Set ID Field** (Añadir campo ID de serie de ciclos) desde el menú +.
24. Haga clic en la cuarta celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Add Run Date Field** (Añadir campo fecha de ciclos) desde el menú +.
25. Haga clic en la última celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Add Comments** (Añadir comentarios) desde el menú +.
26. Haga clic con el botón derecho en la última celda de la tercera columna, a continuación, seleccione **Merge Right** (Combinar a la derecha). Repetir de forma que la celda alcanza al resto de la tabla.
27. Haga clic en la primera celda de la cuarta columna, a continuación introduzca "Given name" (Nombre de pila) y alinee a la derecha.
28. Haga clic en la segunda celda de la cuarta columna, a continuación introduzca "Gender" (Género) y alinee a la derecha.
29. Haga clic en la tercera celda de la cuarta columna, a continuación introduzca "Node Status" (Estado de los ganglios) y alinee a la derecha.
30. Haga clic en la cuarta celda de la cuarta columna, a continuación introduzca "Tumor Size" (Tamaño de tumor) y alinee a la derecha.
31. Haga clic en la primera celda de la última columna, a continuación, seleccione **Add PDF Field** (Añadir campo PDF) desde el menú +.
32. Haga clic en la segunda celda de la última columna, a continuación, seleccione **Add PDF Field** (Añadir campo PDF) desde el menú +.
33. Haga clic en la tercera celda de la última columna, a continuación, seleccione **Add Number of Positive Nodes Field** (Añadir número de campo de ganglios positivos) desde el menú +.
34. Haga clic en la cuarta celda de la última columna, a continuación, seleccione **Add Tumor Size Field** (Añadir campo de tamaño de tumor) desde el menú +.
35. Seleccione el botón **Preview** (Previsualización), situado en la parte superior o inferior de la ventana para ver una muestra del informe configurado.

### LIS Integration (Integración LIS)

Para los clientes que ya cuentan con Laboratory Information Systems (LIS), incluyendo los sistemas de gestión y generación de informes, el sistema de análisis nCounter Dx admite integración directa con dichos sistemas. Al utilizar SSH para las transferencias de archivos, los procesos automatizados externos podrían recuperar el informe resultante en su totalidad o en parte. Los informes recuperados están en formatos apropiados para la integración con procesos y sistemas existentes. Para la integración downstream, el sistema pone a disposición el informe como un archivo PDF idéntico al que puede descargarse a través de la GUI web, como un PDF del informe predeterminado de NanoString (si es distinto del informe actual) y como un conjunto modular de archivos gráficos que pueden incorporarse al resultado de un sistema downstream.

### Acceso al sistema

Para la integración con LIS, el **SSH Server** (servidor SSH) debe estar habilitado (consulte **System Settings** (Configuración del sistema)). El nombre de usuario y contraseña especificados en **SSH Settings** (Configuración SSH) para el ensayo, pueden utilizarse con cualquier herramienta de transferencia de archivos que admita SFTP (Protocolo de transferencia de archivos SSH). Este protocolo es ampliamente admitido por herramientas tales como WinSCP y PUTTY PSFTP sobre Windows y Transmit para Mac OS X. El acceso al servidor SSH es de solo lectura: no es posible modificar, cargar ni mover archivos.

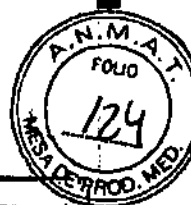
Tras obtener acceso al sistema, los archivos específicos del ensayo se organizan de la forma siguiente:

Dra. SILVINA PINELLA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Abogado  
BioSystems S.A.

**nanoString**

2016-01 MAN-10008-03



6293

Directorio	Descripción y contenido
/ (directorio de inicio de sesión)	Directorio de nivel superior, contiene archivos de exportación XML y todos los subdirectorios enunciados a continuación.
/pdf	archivos PDF. Por cada muestra completada, se presentará siempre el informe estándar de NanoString. En el caso de haber definido un informe personalizado, el archivo PDF del mismo también se incluirá en este directorio.
/image (Imagen)	Directorio de organización de las imágenes modulares.
/image/<nombre base>	Se describe a continuación un directorio de cada muestra, con su nombre. Cada directorio contiene una serie de imágenes que conforman el informe completo del ensayo y un archivo HTML para montar las imágenes en el orden original. Obtenga más detalles a continuación.
/deprecated (descartados)	Todos los archivos que se han "descartado" mediante el uso de la función Edit an Analyzed Sample (Editar una muestra analizada) para generar una repetición del algoritmo del informe u otra actualización. Estos son los archivos originales, sin cambios.

**Imágenes modulares**

Los directorios /image/<nombre base> contienen una serie de imágenes en alta resolución (300 ppp) que podrían ser utilizadas por organizaciones avanzadas. Las imágenes de encabezado, pie de página y firma pueden modificarse para incluir PII u otra información específica de la organización, o también podrían reemplazarse por equivalentes proporcionados por la organización u omitirse completamente. Las imágenes de cuerpo no pueden modificarse y deberían utilizarse de forma completa y solo tal y como aparecen.

El archivo HTML que se incluye sirve como "inventario" y puede utilizarse para asegurarse de que los sistemas downstream hayan recuperado las imágenes del cuerpo y/o de los encabezados y pies de página para cada página del informe. Puede servir como plantilla para ulteriores modificaciones.

**Nombres de archivos**

Todos los formatos comparten un formato común de nombre base:

<AAMDD>\_<IDcartucho>\_<escaneo>\_<Nombre muestra>\_<Canal>

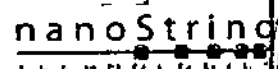
Dónde

<AAMDD>	Los dos últimos dígitos del año, el mes en formato de dos dígitos numéricos y el día en formato de dos dígitos numéricos.
<IDcartucho>	El código de barras que se encuentra en el cartucho.
<escaneo>	Asignado por el sistema. El valor predeterminado habitual es el 1.
<Nombre muestra>	El ID de muestra se introduce en las páginas Create New Run Set (Crear nueva serie de ciclos) o Edit Run Set (Editar series de ciclos) de la aplicación web.
<Canal>	El número de canal del cartucho.

Las extensiones finales del nombre de archivo indican el formato del archivo:

Extensión	Indice
.xml	XML. Contiene datos sin formato del informe específicos de la muestra.
.pdf	PDF. Informe con formato, potencialmente personalizado para cada muestra.
.png	Imágenes con formato de Gráficos de red portátiles.
.html	Archivos con formato HTML. Utilizados para especificar el orden y colocación de los archivos de imágenes.

Dra. SILVINA ZANEA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.M. 4.4  
BIOSYSTEMS S.A.



Lic. Alejandro Diez  
Asesorado  
BIOSYSTEMS S.A.

6293

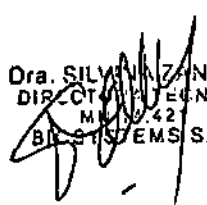



Los nombres de archivos de imágenes cuentan con un componente adicional adjunto tras la parte del <nombre base>. Este componente sirve para identificar los contenidos precisos del archivo. Los elementos incluidos entre corchetes ([]) de la lista siguiente son opcionales y es posible que no existan para todos los informes. Los elementos adicionales para los archivos de imágenes son:

Componente	Índice
_head	Header (Encabezado)
_body#	Body content (Contenido del cuerpo principal) (# indica el número de página)
_foot	Footer (Pie de página)
[_sig]	Línea de firma
[_head2]	Encabezado secundario (solo en informes revisados)
[_foot2]	Pie de página secundario (solo en informes revisados)

En ciertos casos, es posible que existan componentes adicionales entre el nombre del archivo y la extensión. Estos componentes indican información adicional sobre el archivo y aparecerán en el orden siguiente:

Componente	Detalles
[_c]	Informe personalizado. Solo se aplica a archivos PDF. Si no aparece, los archivos son estándares de NanoString.
[_rev]	Informe revisado. En blanco para informes originales sin revisar.
[_<idioma>[_<configuración regional>]]	Idioma opcional y configuración regional opcional para ese idioma. Si no se especifica ningún idioma, _en es el valor predeterminado.

  
 Dra. SILVANA ZANELLA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MESA 42  
 BLSYSTEMS S.A.

  
 Lic. Alejandro Diez  
 Apoderado  
 BLSYSTEMS S.A.



### Archivos (XML) de exportación del ensayo

El archivo de exportación XML está pensado para usuarios avanzados que necesiten acceso a los elementos de datos subyacentes. Se espera que la mayoría de los usuarios no necesiten acceder a este nivel de detalle y puedan utilizar un archivo PDF personalizado o los archivos de imágenes modulares para cubrir sus necesidades de personalización. La información contenida en estos archivos es exclusiva para cada ensayo. Los organizadores y los usuarios individuales que usen esta exportación deberían ponerse en contacto con NanoString en [dxsupport@nanosttring.com](mailto:dxsupport@nanosttring.com) para obtener documentación específica sobre los ensayos y para asegurar que se sigan correctamente las directrices regulatorias apropiadas.

### Editing Sample Information (Edición de la Información de la muestra)

En ocasiones, es posible que sea necesario volver a generar un informe si uno o más parámetros (p. ej. Prosigna, # of Positive Nodes (N.º de ganglios positivos) y Tumor Size (Tamaño del tumor)) se introdujeron de forma incorrecta. Estos parámetros pueden cambiarse en la página Create/Edit Run Set (Crear/Editar series de ciclos) antes de que la muestra se inicie en la Prep Station (estación de preparación). Sin embargo, una vez que la muestra se haya iniciado en la Prep Station (estación de preparación), el administrador será la única persona que pueda editar estos campos y generar un informe nuevo. Esta acción solo se puede realizar una vez por cada muestra. El informe nuevo se marcará como un informe revisado e incluirá los parámetros y los resultados obsoletos como referencia. Asimismo, si la Prep Station (estación de preparación) o el analizador digital se han iniciado antes de descubrir que los parámetros se han introducido de forma incorrecta, no anula el ciclo; deje que se complete y luego edite los parámetros de la muestra para el ciclo revisado.

**IMPORTANTE:** El usuario debe contar con los privilegios para "Create Run Set" (Crear serie de ciclos), así como los del administrador, para acceder a la prueba que corresponde para editar la muestra y volver a realizar el informe. Solo se puede realizar una repetición del informe.

En primer lugar, busque la muestra cuyos parámetros deban modificarse. Puede hacerlo directamente en la página Samples (Muestras) o a través de la página Run Sets (Series de ciclos). Para encontrar la muestra en la página Samples (Muestras), puede filtrar la lista de escaneos para facilitar la búsqueda. Si desea usar los ciclos para encontrar la muestra, seleccione View Run Sets (Ver series de ciclos) en el menú desplegable Runs (Ciclos). En la página Run Sets (Series de ciclos) seleccione la serie de ciclo de la muestra que desea editar. También puede seleccionar un solo informe en la página Reports (Informes).

Una vez que esté en la página Samples (Muestras) o Reports (Informes), seleccione el elemento que desea editar. La muestra no puede ser una muestra de referencia.

>>> El botón Edit Sample (Editar muestra) se activará.

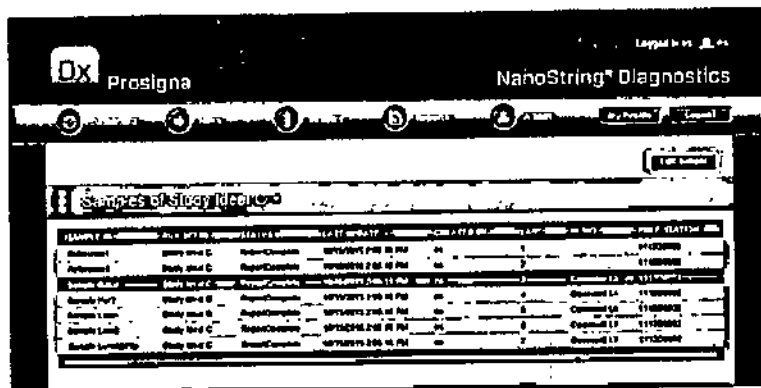


FIGURA 4.51: botón Edit Sample (Editar muestra) activo

Haga clic en el botón Edit Sample (Editar muestra)

>>> Aparecerá la página "Edit Sample" (Editar muestra).

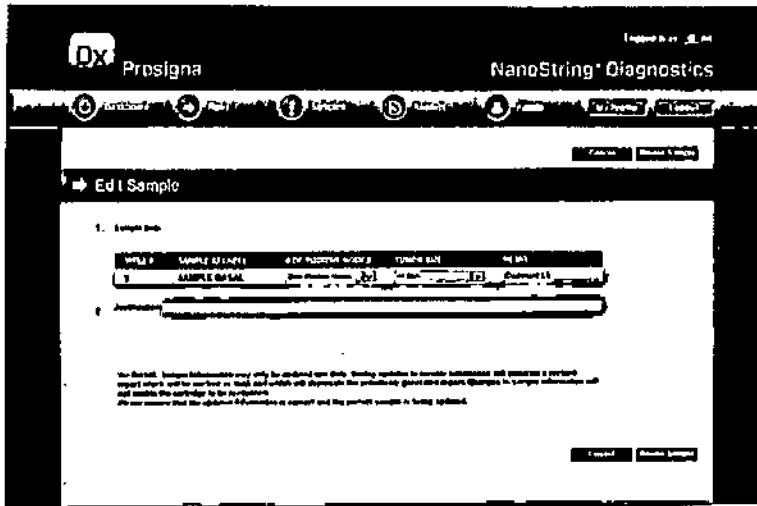


FIGURA 4.52: página Edit Sample (Editar muestra)

Puede revisar los campos de parámetros de la muestra (# of Positive Nodes (N.º de ganglios positivos) y Tumor Size (Tamaño del tumor) en este ejemplo) y Memo (Memorando). Use los controles de entrada para revisar uno o más campos. Cuando haya revisado el campo, el cuadro de texto Justification (Justificación) se activará. El administrador debe introducir una justificación para revisar la muestra.

**7** **IMPORTANTE:** Tenga en cuenta esta advertencia que aparece en esta página:

**WARNING:** Sample information may only be updated one time. Saving updates to sample information will generate a revised report which will be marked as such and which will deprecate the previously generated report. Changes to sample information will not enable the cartridge to be rescanned. Please ensure that the updated information is correct and the correct sample is being updated.

*Handwritten signature/initials*

*Handwritten signature*  
 Dra. SILVIA RIZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 421  
 NANOSTRING S.A.

*Handwritten signature*  
 Lic. Alejandro Díez  
 Apoderado  
 NanoSystems S.A.

*Handwritten signature*  
 59



6293



Asegúrese de que se actualiza la muestra correcta y de que los campos revisados son los correctos. Una vez que introduzca la justificación, haga clic en el botón **Revise Sample** (Revisar muestra). Aparecerá una confirmación final de la revisión (FIGURA 4.53).

**NOTA:** La revisión de la información de la muestra no necesita ni permite que el cartucho vuelva a escanearse en el analizador digital.

Se generará un informe revisado conforme a los parámetros actualizados. El informe revisado se marcará como tal y también incluirá los parámetros y los resultados originales y obsoletos. Cuando se haya generado el informe revisado, este sustituirá al informe original en la página **Report download** (Descargar informe) (FIGURA 4.54). Los informes revisados están señalados con un "\*" tras Sample ID (ID de muestra). El informe original se conservará en el sistema pero no estará disponible para descargarlo en la página **Reports** (Informes).

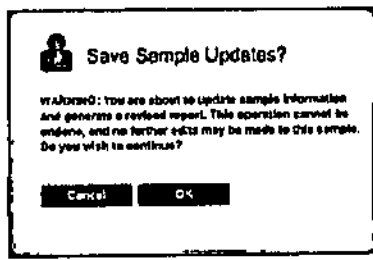


FIGURA 4.53: confirmación para guardar las actualizaciones de la muestra

SAMPLE ID	COMP ID	REPORT DATE	OPERATOR	ASSAY STATUS
1x	XXXXXXXXXX-XXXX	09/02/18 11:00 AM	XXXXXXXXXX	Report Complete
9x	XXXXXXXXXX-XXXX	09/02/18 11:00 AM	XXXXXXXXXX	Report Complete
1x*	XXXXXXXXXX-XXXX	09/02/18 11:00 AM	XXXXXXXXXX	Report Complete
9x*	XXXXXXXXXX-XXXX	09/02/18 11:00 AM	XXXXXXXXXX	Report Complete

FIGURA 4.54: lista de informes con informes actualizados. En este ejemplo, 1x y 9x son informes que se han realizado por segunda vez y tienen parámetros actualizados.

*Handwritten signature*

Dra. SILVIA...  
DIRECCION TECNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Biosystems S.A.



*Handwritten signature*

## 5 Funcionamiento de la Prep Station

### A. Antes de iniciar un ciclo

#### Eliminación de residuos

Antes de iniciar un nuevo ciclo, asegúrese de vaciar los recipientes para residuos. Los recipientes para residuos deben estar vacíos en cada ciclo.



**PRECAUCIÓN:** Si no ha vaciado los recipientes para residuos, las puntas podrían entrar en contacto con residuos líquidos y muestras contaminadas, o un número excesivo de puntas podría aplastarse y provocar un funcionamiento incorrecto del sistema.



**PRECAUCIÓN:** Los utensilios de plástico, tales como reactivos, cartuchos y puntas de pipeta, deben recolectarse y eliminarse de forma adecuada, según las normativas de seguridad locales y los procedimientos estándar de su laboratorio.

1. Extraiga el recipiente para residuos mixtos, elevándolo y sacándolo de la Prep Station (estación de preparación).
2. Extraiga el recipiente para residuos líquidos del recipiente mixto utilizando el cierre de la parte delantera y elimine el líquido de forma adecuada.
  - Debe deshacerse de las puntas en el recipiente para residuos adecuado, tal y como se establece en los procedimientos locales de laboratorio de su organización.
  - Si no se utilizan muestras de riesgo biológico en el sistema, y si están permitidas según los procedimientos de laboratorio, los residuos líquidos pueden eliminarse en el lavabo u otro tipo de desagüe.
3. Compruebe que la gradilla de plástico que sujeta los perforadores utilizados, las boquillas de puntas, las placas de reactivos y los tubos de tira del anterior ciclo se hayan extraído de la cubierta.

#### Productos necesarios

Los productos necesarios para cada ciclo están disponibles como parte del kit de pruebas. El kit incluye los reactivos y productos necesarios para procesar 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30 o 40 muestras de pacientes.

Entre los componentes de un kit de pruebas necesario para utilizar la Prep Station (estación de preparación) se incluyen:

- Código de barras de CodeSet (Incluida la caja de CodeSet interior)
- Cartuchos de muestras
- Placas de reactivos
- Puntas de pipetas
- Boquillas de puntas
- 12 tapones y tiras de tubo
- Tapas adhesivas para cartuchos

Dra SILVIA ZANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
P. 471  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Asesorado  
BIO SYSTEMS S.A.

6293



## B. Inicio de un ciclo

Los siguientes pasos resumen el flujo de trabajo comenzando por la pantalla Welcome (Bienvenida) de la pantalla táctil de la Prep Station (estación de preparación)

1. El usuario debe iniciar sesión en el instrumento para procesar muestras con la Prep Station (estación de preparación). Para iniciar sesión, toque Main Menu (Menú principal) en la pantalla Welcome (Bienvenida).

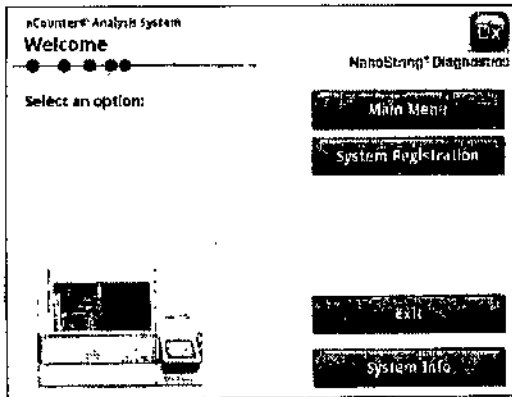


FIGURA 5.1: la pantalla "Welcome" (Bienvenida) de la Prep Station (estación de preparación)

2. Introduzca un nombre de usuario y una contraseña válidos y toque Sign In (Iniciar sesión).

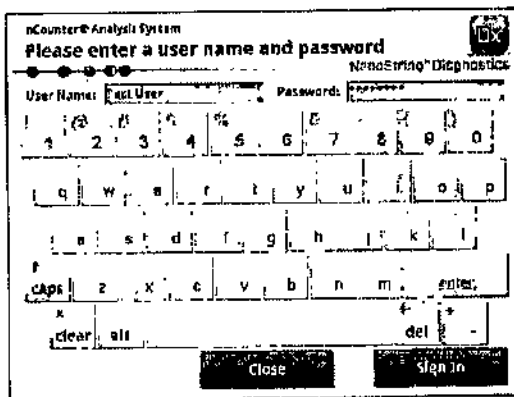


FIGURA 5.2: la pantalla de inicio de sesión

>>> Aparecerá Main Menu (Menú principal) (FIGURA 5.3).

*Handwritten signature*

Dra. SILVIA ANIELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 (M) 421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Drez  
 Apoderado  
 BioSystems S.A.

*Handwritten signature*

6293



3. Para configurar un nuevo ciclo, toque Process Samples (Procesar muestras) del Main Menu (Menú principal).

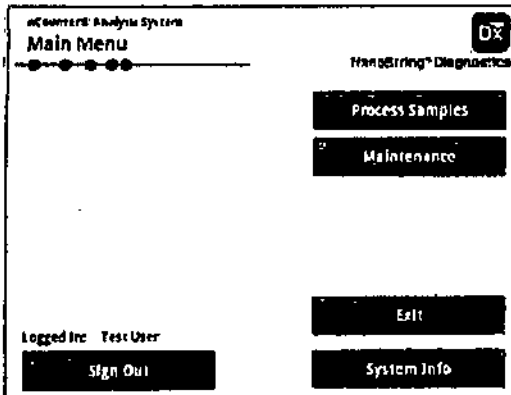


FIGURA 5.3: "Main Menu" (Menú principal) de la Prep Station (estación de preparación)

>>> Aparecerá la pantalla "Process A Run Set" (Procesar una serie de ciclos).

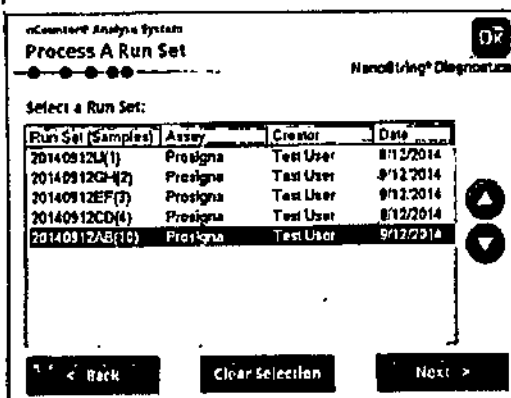


FIGURA 5.4: la pantalla "Process a Run Set" (Procesar una serie de ciclos) muestra el nombre de cada serie de ciclos, el tipo de prueba y el número de muestras que contiene.

NOTA: El botón Exit (Salir) solo aparecerá en la pantalla Welcome (Bienvenida) y Main Menu (Menú principal) si el usuario ha configurado el sistema de análisis nCounter Dx con la opción FLEX (consulte el Capítulo 3: Selección del modo de instrumento).

10

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MESA DE PROD. MED.  
nCounter Dx S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apodado  
BioSystems S.A.

6293



- 4. Seleccione la serie de ciclos que desea procesar tocando el nombre de la serie de ciclos. Utilice las teclas de flecha de la derecha de la pantalla para desplazarse por las selecciones. Toque Next (Siguiete) para continuar.

>>> Aparecerá la pantalla "Review Reaction Layout" (Revisar diagrama de reacción).

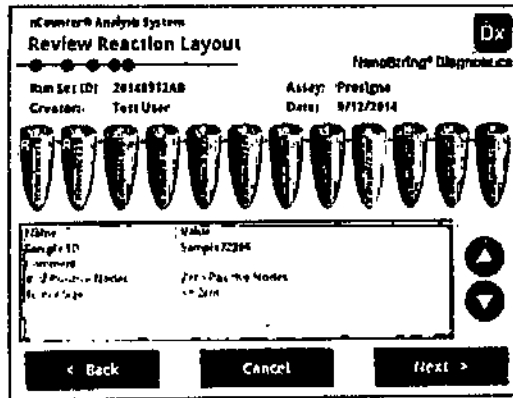


FIGURA 5.5: la pantalla "Review Reaction Layout" (Revisar diagrama de reacción) con dos muestras de referencia (amarillas) y 10 muestras de pacientes (azules). Hay una muestra de paciente seleccionada (verde).

- 5. Toque cada muestra para ver los detalles correspondientes. Compruebe que la serie de ciclos y la información de la muestra sean correctas (FIGURA 5.5). (Si no ser así, vuelva a la aplicación web y realice las correcciones pertinentes (Primero toque Cancel (Cancelar) en la Prep Station (estación de preparación) para que estén disponibles para su edición). Si los valores son correctos, toque Next (Siguiete).

>>> Aparecerá la pantalla "Scan CodeSet" (Escanear CodeSet).

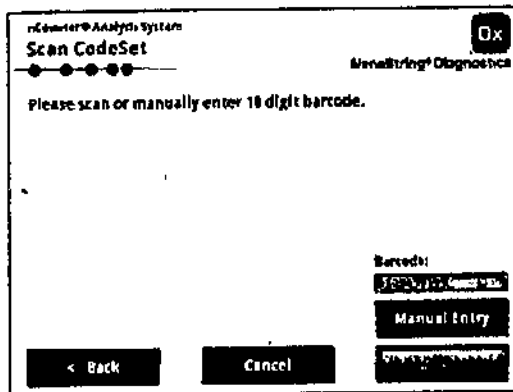


FIGURA 5.6: la pantalla "Scan CodeSet" (Escanear CodeSet)

- 6. El código de barras de CodeSet debe escanearse antes de continuar. Coloque el código de barras de CodeSet delante del lector de código de barras. Aparecerá un rayo de color rojo. Mueva el código de barras delante del rayo rojo hasta que se lea. Una vez que se ha introducido correctamente el código de barras, el número del código de barras aparecerá en el recuadro (FIGURA 5.6).

*Handwritten signature/initials*

NOTA: El código de barras CodeSet debe coincidir con el número de kit CodeSet introducido cuando se creó la serie de ciclos utilizando la aplicación web (FIGURA 4.19).

>>> Aparecerá la pantalla "Reagents And Cartridge" (Reactivos y cartucho).

Dra. S... ANELA  
DIR. TECNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoyado  
BIO SYSTEMS S.A.

6293

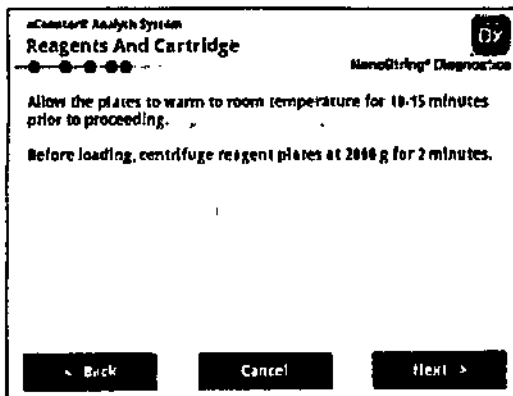
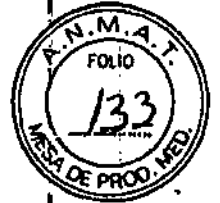


FIGURA 5.7: la pantalla "Reagents And Cartridge" (reactivos y cartucho)

7. Los cartuchos y las placas de reactivos (FIGURA 5.8) deben estar a temperatura ambiente antes de procesarlos.
  - a. Saque las placas de reactivos nCounter de su almacenamiento a 4 °C y los cartuchos nCounter de su almacenamiento a -20 °C. Debe que alcancen la temperatura ambiente durante 10 o 15 minutos.

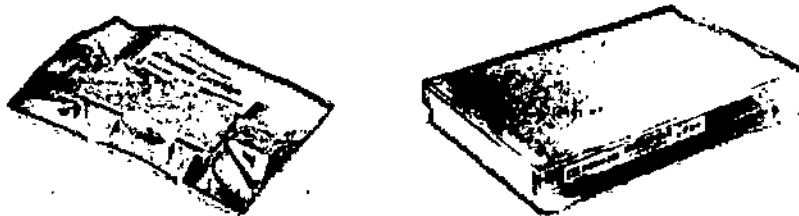


FIGURA 5.8: un cartucho de muestras precintado (izquierda) y placa de reactivos Dx (derecha)

**NOTA:** En los ciclos que utilizan un kit de 1, 2, 3 o 4 pruebas solo se requiere una placa de reactivos.

**NOTA:** No abra la bolsa del cartucho hasta que haya alcanzado la temperatura ambiente. Esto evitará que se produzca condensación en el mismo.

- b. Centrifugue las placas de reactivos a 2000 x g durante 2 minutos para acumular líquidos en la parte inferior de los pozos, antes de cargar las placas de reactivos en la cubierta de la Prep Station (estación de preparación).
  - c. Mientras los cartuchos y las placas alcanzan la temperatura ambiente, continúe con la configuración de la Prep Station (estación de preparación). Toque Next (siguiente).
- >>> Aparecerá la pantalla "Waste Receptacles" (Recipientes para residuos).

*df*

Dra. SILVIA VIZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSENSORS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Abogado  
BIOSENSORS S.A.

*[Handwritten signature]*

629

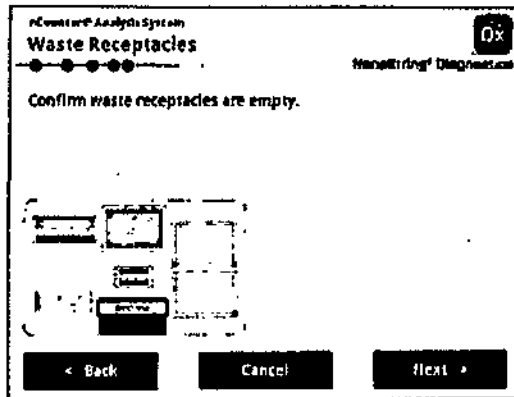
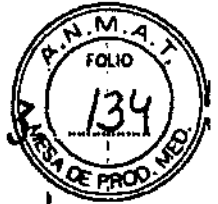


FIGURA 5.9: la pantalla "Waste Receptacles" (Recipientes para residuos)

- 8. Asegúrese de que se han eliminado correctamente los productos desechables del ciclo anterior. Pulse Next (Siguiente).  
 >>> Aparecerá la pantalla "Scan Reagent Plate" (Escanear placa de reactivos).

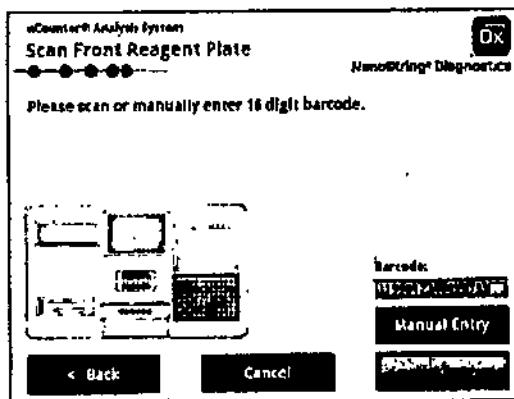


FIGURA 5.10: pantalla Scan Reagent Plate (Escanear placa de reactivos)

- 9. Instrucciones de la pantalla "Reagent Plate" (Placa de reactivos):
  - a. El código de barras de las placas de reactivos debe escanearse antes de continuar. Coloque el código de barras delante del lector de código de barras. Aparecerá un rayo de color rojo. Mueva el código de barras delante del rayo rojo hasta que se registre. Una vez que se ha registrado correctamente el código de barras, el número del código de barras aparecerá en el recuadro y el botón Manual Entry (Entrada manual) cambiará a Clear Entry (Borrar entrada).  
  
Si hay algún problema al escanear el código de barras, el número puede introducirse manualmente. Toque la opción Manual Entry (Entrada manual); aparecerá un teclado numérico. Toque los correspondientes botones para introducir el número. Si comete un error, toque Del (Supr) para retroceder o Clear (Borrar) para empezar de nuevo. Pulse Enter (Introducir) cuando haya finalizado.
  - b. Retire las tapas de plástico transparente y coloque las placas de reactivos en la cubierta, tal y como se indica en la pantalla (FIGURA 5.10).  
  
La cubierta cuenta con pasadores de alineación que facilitarán que las placas permanezcan horizontales, solo si están orientadas correctamente. La placa de reactivos debe colocarse con el código de barras orientado hacia el usuario (FIGURA 5.11). Si la placa está colocada en la dirección incorrecta, la Prep Station (estación de preparación) pausará el protocolo durante el peso de validación hasta que el usuario intervenga.

NOTA: En los kits que utilizan un kit de 1, 2, 3 o 4 pruebas solo se requiere una placa de reactivos. En estos kits, cargue la placa de reactivos en la posición delantera (más cerca del usuario) en la cubierta de la Prep Station (estación de preparación).

NOTA: La Prep Station (estación de preparación) no aceptará códigos de barra de placas que hayan caducado. Asegúrese de que las placas se utilicen antes de la fecha de caducidad.

Dra. SILVINA ZANIELLA  
 DIRECTORA GENERAL  
 M.N. 6.711.171  
 BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
 Gerente de Producto  
 Biosystems S.A.

6293

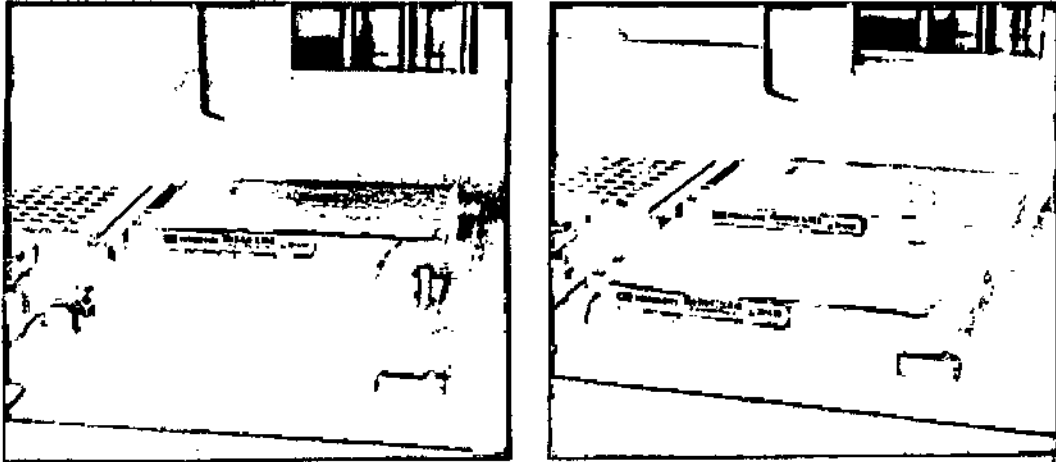


FIGURA 5.11: utilice los pasadores de posicionamiento para garantizar la colocación correcta de las placas de reactivos.

**Ⓜ** **IMPORTANTE:** No retire la lámina de aluminio ni perforo los pozos de las placas de reactivos. La Prep Station (estación de preparación) perfora la lámina de aluminio durante el procesamiento.

c. Toque Next (Siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Tips and Foil Piercers" (Puntas y perforadores de la lámina de aluminio) (FIGURA 5.12).

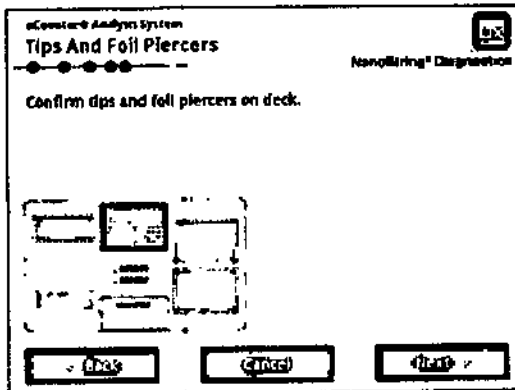


FIGURA 5.12: la pantalla "Tips and Foil Piercers" (Puntas y perforadores de la lámina de aluminio)

10. Instrucciones de la pantalla "Tips And Foil Piercers" (Puntas y perforadores de la lámina de aluminio):

- a. Eleve el soporte metálico para puntas de la cubierta de la Prep Station (estación de preparación) para extraerlo.
- b. Coloque las puntas y los perforadores de la lámina de aluminio en el soporte. Sujete la gradilla de plástico para puntas por las lengüetas centrales; coloque la gradilla sobre el soporte metálico y baje lentamente las puntas hacia el soporte metálico. Regule el colocar el soporte a la altura de los ojos para alinear las puntas de plástico (FIGURA 5.13).

Dra. S. M. N. ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSENSITIVIDAD S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
Biosystems S.A.



0293



FIGURA 5.13: introduzca la puntas y los perforadores de la lámina de aluminio en el soporte metálico para puntas.

NOTA: Hay dos conjuntos de puntas en cada caja y cada lateral de la caja contiene un conjunto de puntas. Al abrir, sujete con firmeza la parte inferior de la caja para evitar que se derrame accidentalmente en el segundo conjunto de puntas.

c. Vuelva a colocar el soporte metálico para puntas cargado en la cubierta de la Prep Station (estación de preparación) con los perforadores de la lámina de aluminio en la posición más cercana a la parte delantera de la cubierta (FIGURA 5.14).

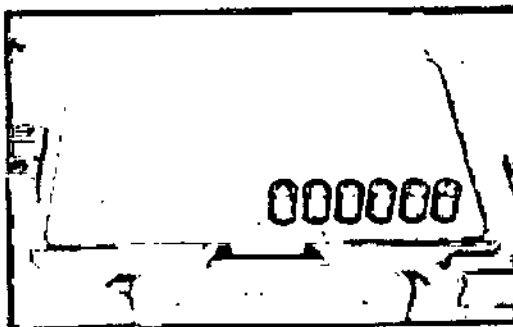


FIGURA 5.14: colocación correcta de la gradilla con las puntas de pipeta y los perforadores de la lámina de aluminio

d. Toque Next (Siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Tip Sheaths" (Boquillas de puntas) (FIGURA 5.15).

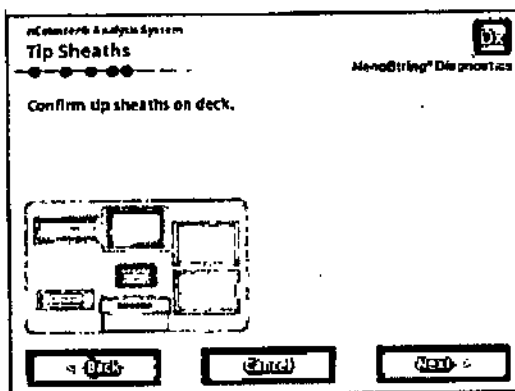
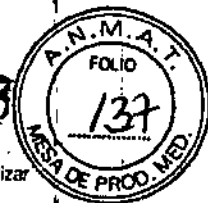


FIGURA 5.15: la pantalla "Tip Sheaths" (Boquillas de puntas)

6293



NOTA: Las boquillas de puntas se utilizan para reducir la cantidad de residuos consumibles. Permiten que el sistema pueda utilizar puntas para un conjunto de 6 muestras y las almacene, mientras que las otras 6 muestras se están procesando.

11. Coloque las boquillas de puntas en la cubierta y presiónelas con firmeza hasta que queden colocadas en su sitio. Toque Next (siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Empty Strip Tubes" (Tubos de tira vacíos) (FIGURA 5.16).

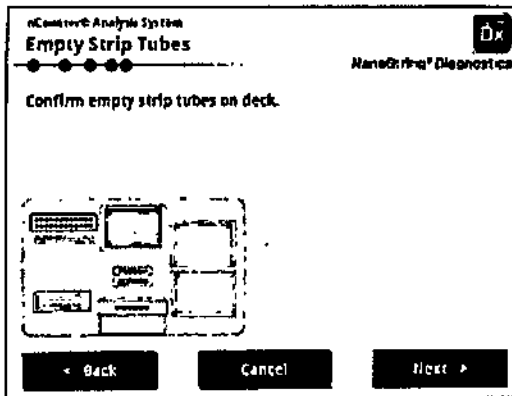


FIGURA 5.16: la pantalla "Empty Strip Tubes" (Tubos de tira vacíos)

12. Coloque los tubos de tira vacíos en el calentador de la cubierta. Toque Next (siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Scan Sample Cartridge" (Escanear cartucho de muestras).

NOTA: En los ciclos que utilizan un kit de 1, 2, 3 o 4 pruebas solo se requiere un tubo de tira de calentador vacío. En estas series de ciclos, cargue el tubo de tira de calentador vacío en la posición delantera del bloque de calor (más cerca del usuario) en la cubierta de la Prep Station (estación de preparación).

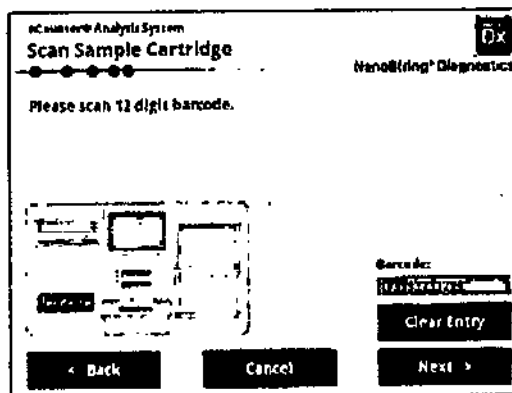


FIGURA 5.17: la pantalla "Scan Sample Cartridge" (Escanear cartucho de muestra)

13. Instrucciones de la pantalla "Sample Cartridge" (Cartucho de muestras):

- a. El código de barras del cartucho de muestras debe escanearse antes de continuar. Coloque el código de barras delante del lector de código de barras. Aparecerá un rayo de color rojo. Mueva el código de barras delante del rayo rojo hasta que se escanee y el número del código de barras aparezca en el campo.

Handwritten mark resembling the number '10'.

NOTA: La Prep Station (estación de preparación) no aceptará códigos de barra de cartuchos que hayan caducado. Asegúrese de que el cartucho se utilice antes de la fecha de caducidad.

nanoString

2016-01 MAN-10008-03

Dra. SILVIA MATELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Asesorado  
Biosystems S.A.

Handwritten signature.



NOTA: No es posible introducir manualmente el código de barras del cartucho. Si la Prep Station (estación de preparación) no escanea ni acepta un código de barras, utilice otro cartucho del mismo kit para el ciclo.

- b. Introduzca un cartucho de muestras debajo de la unidad de electrodos en la dirección indicada en la FIGURA 5.18. Coloque el cartucho sobre la cubierta y deslícelo hasta que quede encajado, evitando que entre en contacto con los electrodos. Asegúrese de que esté correctamente colocado en la ranura mecanizada. Si se coloca correctamente, se activará un cierre y la unidad se fijará en su lugar. Si no se coloca correctamente, los electrodos pueden doblarse al cerrar la unidad de electrodos.

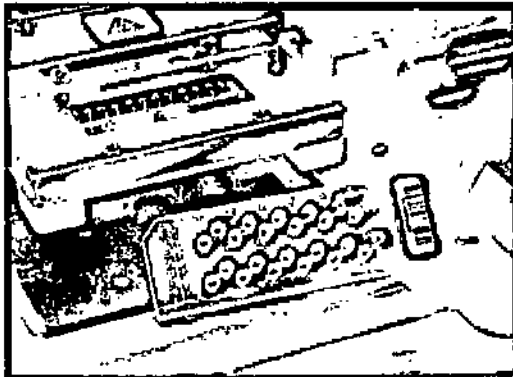


FIGURA 5.18: introduzca un cartucho sin utilizar en la Prep Station (estación de preparación) en la dirección indicada

- c. Toque Next (Siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Secure Electrode Fixture" (Unidad de electrodos segura).

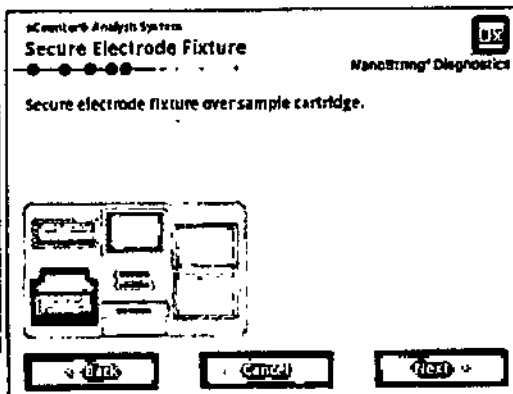


FIGURA 5.18: la pantalla "Secure Electrode Fixture" (Unidad de electrodos segura)

JP

- 14. Baje con cuidado la unidad de electrodos colocada sobre el cartucho (FIGURA 5.20). Los 24 electrodos deben introducirse fácilmente en los 24 pozos. Toque Next (siguiente).

BIOSYSTEMS S.A.  
CALLE 21  
SANTO DOMINGO, D.R.

Lic. Alejandro Diez  
Rodríguez  
BioSystems S.A.

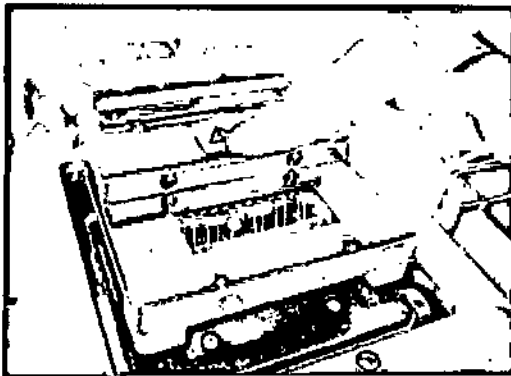


FIGURA 5.20: baje con cuidado la unidad de electrodos colocada sobre el cartucho.

**70** **IMPORTANTE:** No utilice la palanca de liberación para bajar la unidad. Si lo hace, la unidad no podrá bloquearse. En cambio, presione en el cuerpo de la unidad, en un punto alejado de la palanca de liberación (FIGURA 5.20).

**71** **IMPORTANTE:** Si se produce cierta resistencia al bajar la unidad, detenga y ajuste levemente la posición del cartucho. Asegúrese de que los electrodos estén alineados correctamente. Si los electrodos no están alineados, vuelva a alinearlos mediante el uso del flujo de trabajo "Align Electrodes" (Alinear electrodos) en el menú Maintenance (Mantenimiento). La Prep Station (estación de preparación) no podrá procesar ninguna de las muestras, si los electrodos se encuentran doblados.

>>> Aparecerá la pantalla "Hybridized Samples" (Muestras híbridas) (FIGURA 5.21).

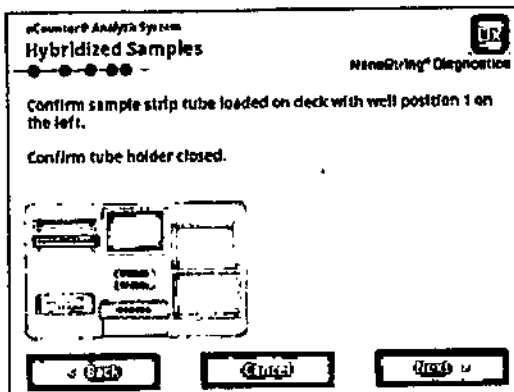
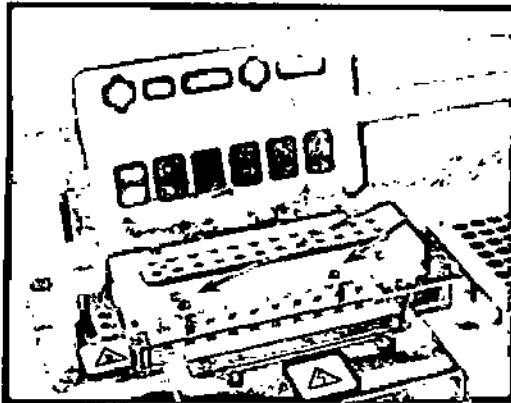


FIGURA 5.21: la pantalla "Hybridized Samples" (Muestras híbridas)

- Coloque el tubo de tira de muestras híbridas sobre la cubierta de la Prep Station (estación de preparación) y asegúrese de que el pozo 1 esté alineado con la posición 1 (FIGURA 5.22). Tenga en cuenta que el tubo de tira cuenta con tiras asimétricas, y si se coloca de forma incorrecta, la tapa no cerrará correctamente.

8



Los tubos de tira de muestras híbridas cuentan con dos muescas para garantizar la orientación adecuada.

FIGURA 5.22: tubos de tira de muestras híbridas con guías de orientación dentadas

**IMPORTANTE:** No deje que las muestras híbridas permanezcan a temperatura ambiente durante más de 15 minutos. Si se producen retrasos entre la extracción de las muestras híbridas del bloque de calor y la puesta en funcionamiento de la Prep Station (estación de preparación), vuelva a almacenar las muestras a 65 °C hasta que puedan procesarse. No supere el tiempo de hibridación máximo indicado en el prospecto de la prueba.

**IMPORTANTE:** Todos los tubos deben colocarse correctamente y de forma uniforme en la gradilla para garantizar un procesamiento adecuado. Asegúrese de que ha quitado todas las tapas de los tubos de las muestras híbridas antes de colocarlos sobre la cubierta. Si las deja puestas, el protocolo se pausará y el usuario tendrá que intervenir.

**IMPORTANTE:** Utilice únicamente tubos de tira suministrados por NanoString. Otros tubos tienen distintas dimensiones y provocarán errores en el sistema.

- a. Cierre de forma segura la tapa que se pliega sobre los tubos (FIGURA 5.23).

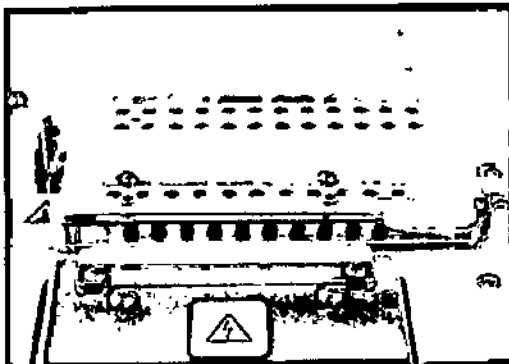
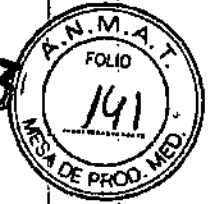


FIGURA 5.23: tapa cerrada sobre los tubos

- b. Toque Next (Siguiente).

**IMPORTANTE:** Si no cierra de forma segura la tapa sobre los tubos, el sistema podría funcionar incorrectamente. Si la tapa metálica no se cierra por completo, el sensor mostrará un mensaje de error y el ciclo no podrá comenzar hasta que se corrija el error.

6293



>>> Aparecerá la pantalla "Notification Options" (Opciones de notificación) (FIGURA 5.24).

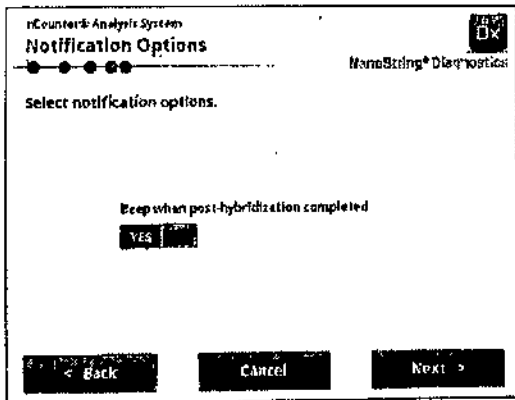


FIGURA 5.24: la pantalla "Notification Options" (Opciones de notificación)

16. Seleccione si desea que la Prep Station (estación de preparación) emita una alarma sonora cuando el procesamiento haya finalizado. Toque Next (siguiente).

>>> Aparecerá la pantalla "Start Deck Validation" (Iniciar validación de la cubierta)

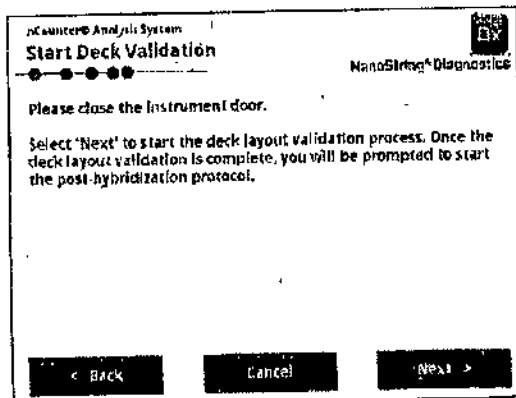


FIGURA 5.25: la pantalla "Start Deck Validation" (Iniciar validación de la cubierta)

- a. Toque Next (Siguiente) para iniciar la validación.
- b. La Prep Station (estación de preparación) nCounter comprobará que todos los productos y reactivos se hayan colocado correctamente sobre la cubierta (FIGURA 5.26). Para ello, la Prep Station (estación de preparación) confirma que los sensores del cartucho de muestra, la unidad de electrodos y la tapa del calentador se encuentran en perfecto estado. El cabezal de la pipeta comprueba que las puntas, las boquillas de puntas, los tubos de tira y las placas de reactivos estén correctamente colocados mediante el uso de un conjunto de puntas de validación. No se alarme si la Prep Station (estación de preparación) está en contacto con los productos; esto forma parte del funcionamiento normal. Si la Prep Station (estación de preparación) determina que un producto está colocado de forma incorrecta, le indicará al usuario cómo corregir la configuración.

Handwritten mark resembling the number '10'.

nanoString  
Dra. SILVANA ZANELA  
BOULEVARD AN-10008-02  
MN 14.421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Aradardo  
BIO SYSTEMS S.A.

Handwritten signature.

6293

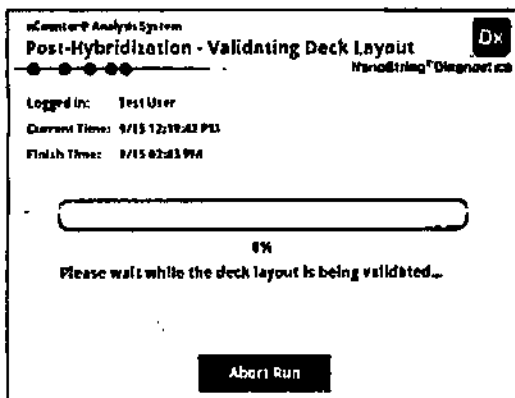


FIGURA 5.26: la pantalla "Post-Hybridization - Validating Deck Layout" (Posthibridación - Validación de disposición de la cubierta)

c. Una vez finalizada la validación de la cubierta (FIGURA 5.27), aparecerá una nueva pantalla que incluye el botón Start Processing (Iniciar procesamiento). Toque Start Processing (Iniciar procesamiento) para iniciar el ciclo.

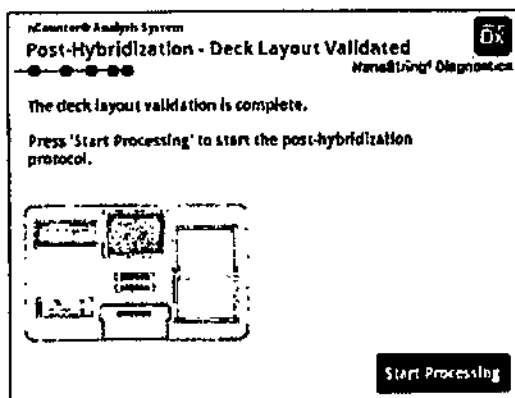


FIGURA 5.27: la pantalla "Post-Hybridization - Deck Layout Validated" (Posthibridación - Validación de disposición de la cubierta)

- i** **IMPORTANTE:** Si se pausa un ciclo, reanódelo lo antes posible. El sistema no debe estar en pausa durante más de 15 minutos o la prueba deberá repetirse en las muestras afectadas.
- i** **IMPORTANTE:** Si se anula un ciclo, este no podrá reiniciarse y la prueba deberá repetirse en las muestras afectadas. Si desea obtener información sobre cómo repetir la prueba, consulte el prospecto de la prueba.

17. Una vez finalizado el procesamiento de la muestra, aparecerá una pantalla azul y el temporizador comenzará a contar desde el momento en que finalizó el ciclo (FIGURA 5.28). Toque Next (siguiente).

JS

Dra SILVIA ZANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
BIOSENSORS S.A.

Lic. Alejandra Díez  
Producción  
BioSystems S.A.

6 2 9 ' 3 1

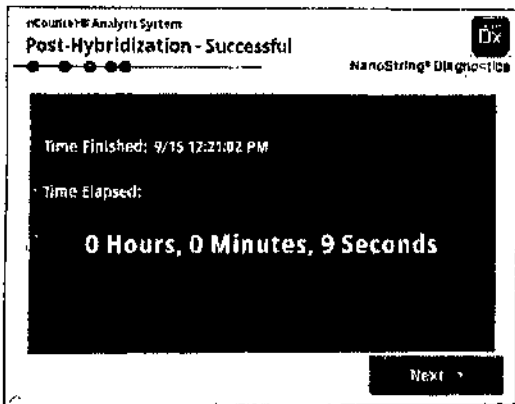


FIGURA 5.28: la pantalla System Processing Complete (Procesamiento del sistema finalizado)

18. La pantalla "Run Successfully Completed" (Ciclo finalizado correctamente) indica los pasos a seguir después del procesamiento de la muestra, entre los que se incluyen:

- a. Extracción y eliminación de placas de reactivos vacías.
- b. Extracción y eliminación de gradillas para puntas vacías y perforadores de la lámina de aluminio.
- c. Extracción y eliminación de tiras de muestras.
- d. Extracción del cartucho de muestra y sellado de los pozos.

19. Para extraer la unidad una vez finalizado el ciclo, tire del pasador, ubicado en la parte superior del dispositivo, hacia arriba y hacia la parte delantera del sistema con el dedo, tal y como se muestra en la FIGURA 5.29.

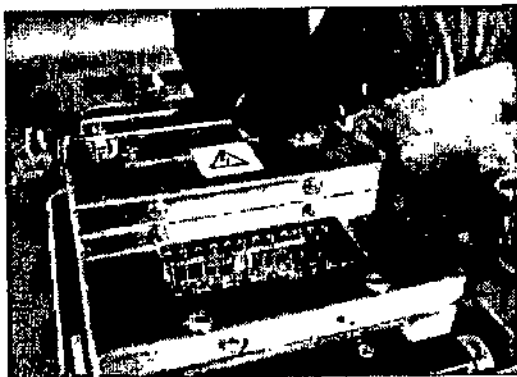
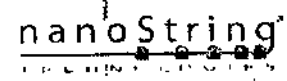


FIGURA 5.29: extracción de la unidad tras realizar un ciclo

20. Una vez finalizado el procesamiento, es importante realizar lo siguiente:

- a. Precintar los pozos inmediatamente con la cubierta adhesiva suministrada para evitar la evaporación.
- b. Las muestras deben protegerse de la luz todo lo posible.
- c. Si el cartucho no va a escanearse en el analizador digital en el plazo de una hora, el cartucho precintado debería guardarse a 4 °C en una caja opaca. El cartucho puede guardarse de este modo durante una semana con la mínima degradación.
- d. Vaciar los recipientes para residuos

21. Toque Finish (Finalizar) para volver al Main Menu (Menú principal).



2016-01 M... 10008-03  
Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
14 421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Rodríguez  
BioSystems S.A.



## 6 Funcionamiento del analizador digital

### A. Inicio de un ciclo

1. Para escanear un cartucho con el analizador digital, el usuario debe iniciar sesión en el instrumento. Para iniciar sesión, toque Main Menu (Menú principal) en la pantalla Welcome (Bienvenida).

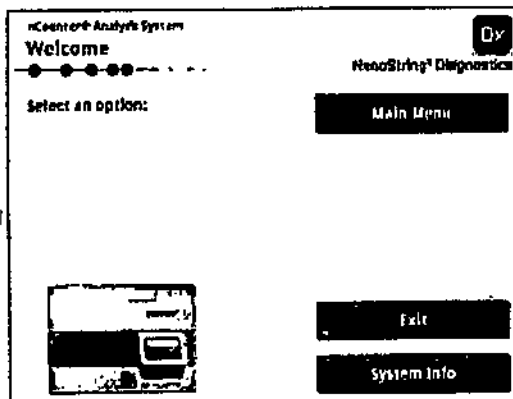


FIGURA 6.1: La pantalla "Welcome" (Bienvenida) del analizador digital

2. Introduzca un nombre de usuario y una contraseña válidos y toque Sign In (Iniciar sesión).

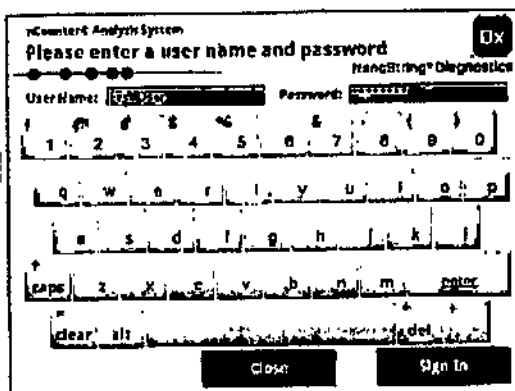


FIGURA 6.2: la pantalla de inicio de sesión

>>> Aparecerá la pantalla Main Menu (Menú principal).

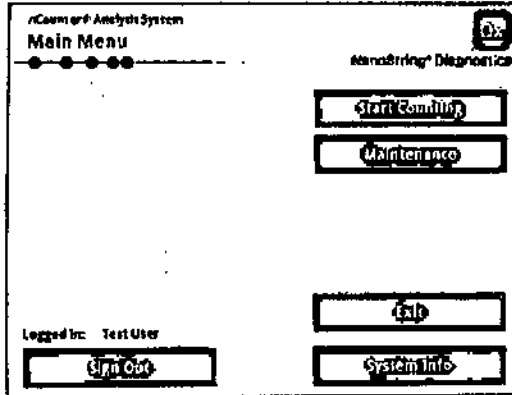


FIGURA 6.3: la pantalla "Main Menu" (Menú principal) del analizador digital

**NOTA:** El botón Exit (Salir) solo aparecerá en la pantalla Welcome (Bienvenida) y Main Menu (Menú principal) si el usuario ha configurado el sistema de análisis nCounter Dx con la opción FLEX (consulte el Capítulo 3: Selección del modo de instrumento).

**IMPORTANTE:** Si un laboratorio cuenta con más de un analizador digital, el cartucho debe escanearse en el mismo instrumento registrado en la Prep Station (estación de preparación) utilizada anteriormente para procesar las muestras (consulte el Capítulo 4: Funcionamiento de la aplicación web).

- Coloque el cartucho de muestra en una ranura vacía. Asegúrese de que el cartucho esté introducido en la dirección correcta (la ranura y el cartucho cuentan con estrías para garantizar la posición correcta), y está colocado horizontalmente en la ranura. El código de barras deberá estar orientado hacia arriba (FIGURA 6.4). Cierre el soporte magnético sobre el cartucho introducido en la ranura y cierre la compuerta del analizador digital.

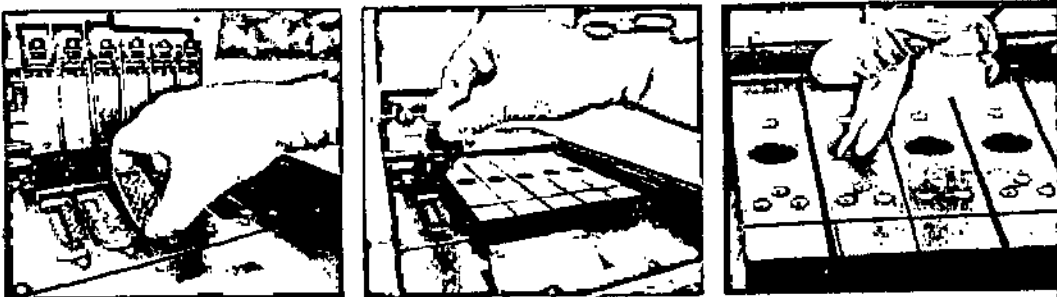


FIGURA 6.4: coloque los cartuchos con el código de barras orientado hacia el usuario al introducirlos en el analizador digital. Cierre los clips magnéticos y asegúrese de presionar la placa metálica que está encima del cartucho después de cerrar la tapa para garantizar que el cartucho esté colocado horizontalmente.

- Seleccionar Start Counting (Iniciar recuento).

>>> Aparecerá la pantalla "Checking Stage Configuration" (Comprobando configuración de la fase).

6293

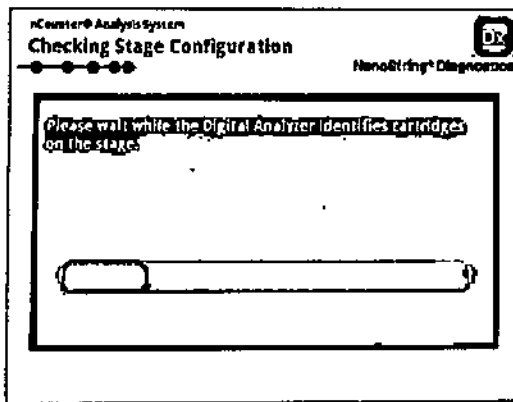


FIGURA 6.5: la pantalla "Checking Stage Configuration" (Comprobando configuración de la fase)



NOTA: El analizador digital realiza un seguimiento de los estadios que ya se han escaneado, están escaneándose o están a la espera de escanearse.

4. El escáner utilizará el código de barras para buscar la serie de ciclos asociada a dicho cartucho y determinar si el cartucho ya está listo para escanearse. Una vez que se han comprobado las seis posiciones, aparecerá la pantalla Counting Cartridge (Recuento de cartucho). Cada ranura tiene cinco posibles estados:

- Ubicación vacía (sin gráfico): esta ranura está vacía y no puede cargarse con un nuevo cartucho.
- Cartucho blanco: esta ranura incluye un cartucho que se ha registrado, pero aún no se ha escaneado. **NO EXTRAIGA ESTE CARTUCHO.**
- Cartucho parcialmente azul: esta ranura incluye un cartucho que se ha escaneado de forma incompleta. **NO EXTRAIGA ESTE CARTUCHO.**
- Cartucho completamente azul: se ha realizado el escaneo de este cartucho.
- Un icono y texto sobre un cartucho: indica que puede haberse producido un problema durante el escaneo del cartucho. Toque el icono o el cartucho para obtener más información.

En el ejemplo mostrado en la FIGURA 6.6, el cartucho de la ranura 1 se está escaneando y los cartuchos de las ranuras 2, 3, 4, 5 y 6 están esperando a ser escaneados.

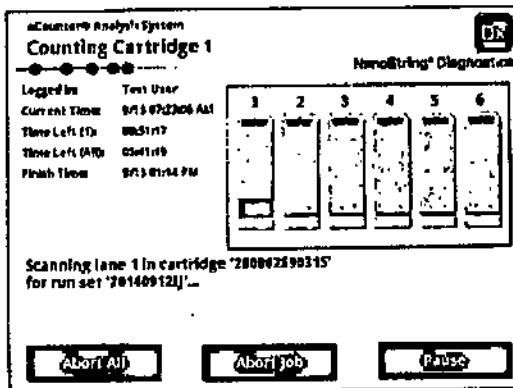


FIGURA 6.6: la pantalla "Counting Cartridge" (Recuento de cartucho) con el cartucho actual indicado

NO

Dra. SILVIA DELA ELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

6293



NOTA: Es posible volver a escanear los cartuchos anteriormente anulados. Al colocar un cartucho en el analizador digital, la pantalla Counting Cartridge (Recuento de cartucho) mostrará "ABORTED" (ANULADO) para dicho cartucho. Para volver a escanear un cartucho, pulse el icono del cartucho. Aparecerá una pantalla con la opción de volver a escanear. Si esto se realiza mientras se escanea un cartucho, tenga en cuenta que el estado del cartucho permanecerá pendiente hasta que el resto de cartuchos se haya escaneado hasta que el escaneo se haya pausado y reanudado.

- 5. Compruebe que aparece una pequeña barra de color azul en la parte inferior del cartucho que está escaneándose; esto indica que el escaneo ha comenzado. Se escuchará una serie de clics rítmicos a medida que las imágenes se están recolectando.
- 6. Para agregar un cartucho a un analizador digital que ya está realizando el recuento, toque el botón Pause (Pausar) en la pantalla "Counting Cartridges" (Recuento de cartuchos). El analizador digital puede tardar unos minutos en obtener un punto de parada óptimo (FIGURA 6.7). La compuerta se desbloqueará cuando lo obtenga. Coloque el nuevo cartucho en una ranura vacía o sustituya un cartucho que ya se ha escaneado. Toque el botón Resume (Reanudar). La compuerta debe volver a bloquearse y el recuento se reanudará.

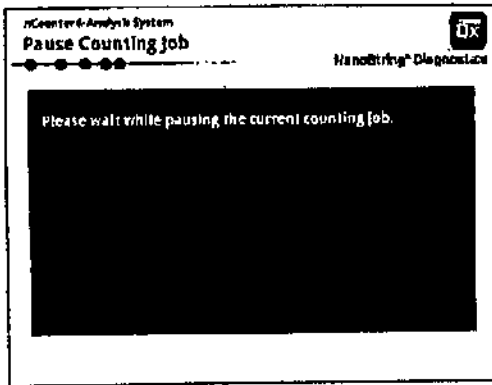


FIGURA 6.7: la pantalla "Pause Counting Job" (Pausar recuento de trabajo)

- 7. Una vez finalizado el escaneo de un cartucho, el usuario recibirá una notificación por correo electrónico y la pantalla de procesamiento indicará que el cartucho se ha completado (FIGURA 6.8). Después de recibir la notificación por correo electrónico de que el escaneo ha finalizado, quite el cartucho completado. Si se produce un error en el instrumento o no está disponible, guarde el cartucho en una caja opaca (para protegerlo de la luz) a 4 °C durante una semana como máximo. Póngese en contacto con [dxsupport@nanosttring.com](mailto:dxsupport@nanosttring.com) para obtener ayuda.

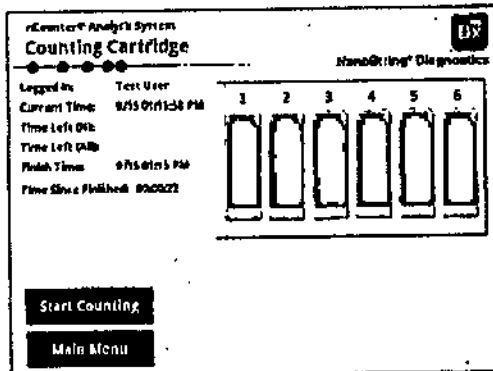


FIGURA 6.8: la pantalla "Counting Cartridge" (Recuento de cartucho) con seis cartuchos completados

108















- 8. Al utilizar el enlace que se incluye en el correo electrónico de notificación, abra la interfaz web y descargue todos los informes de diagnóstico asociados con la serie de ciclos que se acaba de completar, tal y como se describe en el Capítulo 4: Funcionamiento de la aplicación web.

nanoString  
 2018-01 MAN-10008-03  
 V. CANELA  
 D. C. TÉCNICA  
 4.421  
 BIO SYSTEMS S.A.

H. Diez  
 Apodado  
 BioSystems S.A.



# Símbolos y definiciones

-  - Fabricante
-  - Representante autorizado en la Comunidad Europea
-  - Dispositivo médico para diagnósticos *in vitro*
-  - Consultar las instrucciones de uso
-  - Marca CE
-  - Número de referencia o catálogo
-  - Código/número de lote
-  - Número de serie
-  - Incluye cantidad suficiente para <math>\leq 10</math> pruebas
-  - Temperatura en condiciones de almacenamiento
-  - Temperatura mínima en condiciones de almacenamiento
-  - Temperatura máxima en condiciones de almacenamiento
-  - Utilizar antes de fecha de caducidad
-  - Fecha de fabricación

Room Temp. = Temperatura ambiente  
 HYB = Hibridación

Exención de responsabilidad  
 Para uso en diagnósticos *in vitro*.

*Handwritten mark*

*Handwritten signature*  
 Dra. SILVIA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SIGSYS S.A.

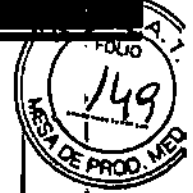
2016-01 MAN-10008-03

**nanoString**  
 PLATFORM

*Handwritten signature*  
 Lic. Alejandro Diez  
 Agente de  
 Sigsys S.A.



6293



**NanoString Technologies, Inc.**  
530 Fairview Ave N  
Suite 2000  
Seattle, Washington 98109EE UU.

**CONTACTO**  
Info@nanosttring.com  
Tel.: +1.888.358.6266  
Fax: +1.206.378.6288  
www.nanosttring.com

**INFORMACIÓN**  
Estados Unidos: us.sales@nanosttring.com  
Europa: europe.sales@nanosttring.com  
Otras regiones: info@nanosttring.com

© 2013-2016 NanoString Technologies, Inc. Todos los derechos reservados.  
NanoString Technologies, NanoString, el logotipo de NanoString, nCounter y ProSigna son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de NanoString Technologies, Inc. en los Estados Unidos y en otros países. El resto de marcas comerciales y/o marcas de servicio que no pertenecen a NanoString y que aparezcan en este manual son propiedad de sus respectivos propietarios.

2016-01 MAN-10008-03

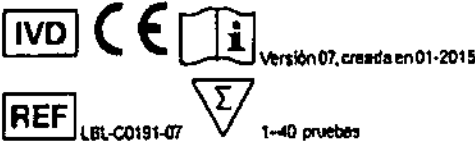
*SP*



**J. S. ZANELA**  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
2016-01 MAN-10008-03  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
Biosystems S.A.

Prospecto  
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay  
(prueba Prosigna® de firma genética para el pronóstico del  
cáncer de mama)



Condiciones de almacenamiento

Cartuchos de prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama
CodeSet de prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama
Prep Pack de prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama
Prep Placas de prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama

INDICE

1 FINALIDAD/USO PREVISTO ..... 1

2 RESUMEN DEL SISTEMA DE PRUEBA ..... 1

2.1 Principios del sistema de análisis nCounter Dx ..... 2

2.2 Principios del algoritmo Prosigna para el cálculo de resultados ..... 2

3 REACTIVOS Y EQUIPO FACILITADOS ..... 2

3.1 Descripción general del kit Prosigna ..... 2

3.2 Contenido del kit Prosigna en kits Prosigna de 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30 o 40 pruebas ..... 3

4 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES ..... 3

5 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PRUEBA ..... 3

5.1 Procesamiento de tejidos ..... 3

5.2 Cómo realizar la prueba Prosigna ..... 4

INFORMACIÓN SOBRE FORMACIÓN ..... 4

6 MANIPULACIÓN DE RESIDUOS ..... 4

7 ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN (REACTIVOS) ..... 4

9 INSTRUMENTOS NECESARIOS PARA PROSIGNA ..... 4

10 REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS Y NO INCLUIDOS ..... 4

10.1 Materiales ..... 4

10.2 Equipo ..... 4

10.3 Especificaciones del equipo ..... 4

11 RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE ESPÉCIMENES ..... 5

11.1 Requisitos de especímenes de tejido y revisión patológica ..... 5

11.2 Recogida y procesamiento de especímenes ..... 5

11.3 Preparación de portaobjetos ..... 5

11.4 Procesamiento de portaobjetos ..... 5

11.5 Aislamiento de ARN ..... 6

11.6 Mida la calidad y la concentración del ARN ..... 6

11.7 Procedimiento de la prueba ..... 7

12 SOLUCIÓN DE PROBLEMAS Y FALLOS DE PRUEBAS ..... 9

13 RESULTADOS DE LA PRUEBA ..... 9

13.1 Subtipos intrínsecos ..... 9

13.2 ROR ..... 10

13.3 Probabilidad de recurrencia a distancia a 10 años ..... 10

13.4 Clasificación del riesgo ..... 10

13.5 Control de calidad ..... 10

14 LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS ..... 10

15 VALORES ESPERADOS ..... 11

15.1 Intervalo de ROR por subtipo ..... 11

15.2 Frecuencia de ROR según estado de los nodos se tratará solo con terapia endocrina adyuvante, si se utiliza junto con otros factores clinicopatológicos. .... 11

15.3 Supervivencia sin recurrencia a distancia según categorización del riesgo ..... 12

16 CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS ..... 12

16.1 Precisión y reproducibilidad de los análisis ..... 12

16.2 Sensibilidad ARN utilizado ..... 13

16.3 Pruebas de interferencia ..... 13

16.4 Resultados clínicos ..... 14

17 BIBLIOGRAFÍA ..... 25

18 SÍMBOLOS Y DEFINICIONES ..... 26

19 DATOS DE CONTACTO ..... 26

1 FINALIDAD/USO PREVISTO

La prueba Prosigna® de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama es una prueba diagnóstica *in vitro* que utiliza el perfil de expresión génica de células encontradas en tejido con cáncer de mama para evaluar el riesgo de recurrencia a distancia en un paciente. La prueba mide el perfil de expresión génica de RNA extraído de tejido de tumor de mama fijado en formaldehído e incluido en parafina (FFPE). Los datos de expresión génica se estudian junto con variables clínicas para generar un subtipo (luminal A, luminal B, HER2 enriquecido o de tipo basal) y una puntuación que indica la probabilidad de recurrencia a distancia de la enfermedad. La prueba se realiza con el sistema de análisis nCounter® Dx de NanoString utilizando tejido de tumor de mama FFPE diagnosticado previamente como carcinoma de mama invasivo.

La prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama está indicada para pacientes mujeres con cáncer de mama intervenidas con cirugía de mastectomía o con terapia de conservación de la mama junto con el tratamiento locoregional correspondiente al tratamiento habitual, con las siguientes opciones:

- a. Un indicador de pronóstico de supervivencia sin recurrencia a distancia a 10 años en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos (HR+) y nodos linfáticos negativos en fases I o II que se tratará solo con terapia endocrina adyuvante, si se utiliza junto con otros factores clinicopatológicos.
- b. Un indicador de pronóstico de supervivencia sin recurrencia a distancia a 10 años en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos (HR+) y nodos linfáticos positivos (1-3 nodos positivos, o 4 o más nodos positivos) en estadios II o IIIA que

2 RESUMEN DEL SISTEMA DE PRUEBA

El sistema de análisis nCounter Dx de NanoString ofrece mediciones directas multiplexadas de la expresión génica mediante lecturas digitales de la abundancia relativa de transcripciones de mRNA que siguen estos pasos: 1) hibridación del ARN (hibridación del ARN en Reporter Probes and Capture Probes (sondas de captura y sondas de marcación) fluorescentes, 2) purificación de los complejos blanco/sonda utilizando Prep Plates (placas de preparación) nCounter con los reactivos necesarios para el procesamiento poshibridación y la inmovilización en el cartucho nCounter de la Prep Station (estación de preparación) nCounter, y 3) análisis del Cartridge (cartucho) nCounter en el analizador digital nCounter para obtener el resultado de la prueba. Tanto las sondas de captura como las de marcación contienen secuencias de sondas de ADN únicas para la purificación e hibridación de blancos. Las sondas de captura y marcación se combinan con los controles positivos y negativos para formar el CodeSet. Prosigna mide simultáneamente los niveles de expresión de 50 genes utilizados en el algoritmo de clasificación de subtipos intrínsecos, 8 genes constitutivos utilizados para la normalización de la señal, 8 controles positivos y 8 controles negativos en una sola reacción de hibridación con sondas de ácido nucleico diseñadas específicamente para esos genes. El kit Prosigna también incluye una referencia sample (muestra de referencia) formada por blancos de ARN transcritos *in vitro* para cada uno de los 56 genes. La referencia sample (muestra de referencia) se prueba con cada lote de muestras de ARN del paciente para cuantificar el ciclo y normalizar la señal de cada gen.

La prueba Prosigna se realiza en ARN aislado del tejido del tumor de mama FFPE. Un patólogo examina el portaobjetos teñido con hematoxilina y eosina (H&E) e identifica (y marca) el área de carcinoma de mama invasivo adecuada para la prueba. El patólogo también mide el área de la superficie del tumor, que determina el número de portaobjetos sin teñir que son necesarios para la prueba, y la celularidad del tumor para garantizar la presencia de suficiente tejido tumoral para la prueba. Un técnico cualificado macrodissecta el área en los portaobjetos sin teñir que corresponde al área del tumor marcada en el portaobjetos teñido con H&E y aísla ARN del tejido. Entonces se prueba el ARN aislado en el sistema de análisis nCounter Dx de NanoString para ofrecer los resultados de la prueba, incluyendo el subtipo intrínseco, el riesgo de recurrencia (ROR) y la categoría del riesgo.

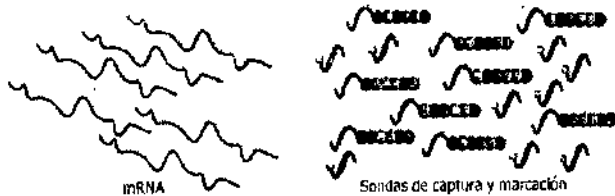
Lic. Alejandro Diez  
Responsable  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BioSystems S.A.

## 2.1 Principios del sistema de análisis nCounter Dx

El sistema de análisis nCounter Dx utiliza pares de sondas específicas para determinados genes (Figura 1) que se hibridan directamente con la muestra de mRNA en solución, eliminando reacciones enzimáticas que podrían introducir sesgos en los resultados. En el primer paso de la prueba las sondas de ADN se hibridan directamente con una región de 70-100 pares de bases de la muestra de ARN en solución. La sonda de marcación fluorescente consiste en una secuencia de 35-50 pares de bases complementaria del blanco de mRNA y una única secuencia de esqueleto de ADN que se hibrida con seis segmentos de ARN etiquetados con una de las cuatro tinturas fluorescentes siguientes: roja (R), amarilla (Y), azul (B) o verde (G). Los segmentos fluorescentes crean un "código de color" fluorescente de seis posiciones y cuatro colores único para cada blanco. Una sonda de captura independiente está formada por una secuencia de 35-50 pares de bases complementaria del blanco de mRNA y biotina, que se usa para la inmovilización en un portaobjetos con una capa de estreptavidina.

Figura 1: hibridar CodeSet con mRNA



Tras la hibridación, todos los pasos de purificación de la muestra están automatizados en la estación de preparación nCounter. En primer lugar, se eliminan las sondas de captura y marcación sobrantes (Figura 2) mediante pasos sucesivos de captura mediante esferas magnéticas seguidos de la vinculación de los complejos sonda-blanco con ubicaciones aleatorias en la superficie del cartucho nCounter a través de un ligamiento estreptavidina-biotina (Figura 3). Por último, los complejos sonda/blanco se alinean e inmovilizan (Figura 4) en el cartucho nCounter.

Figura 2: eliminar marcadores sobrantes

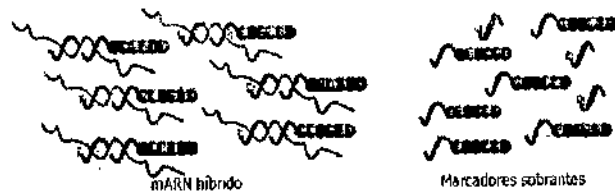


Figura 3: vincular marcadores híbridos con la superficie del cartucho

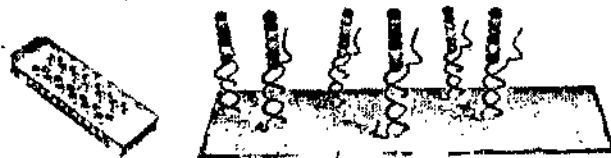


Figura 4: alinear e inmovilizar marcadores híbridos



Una vez completado el procesamiento de las muestras, el cartucho se coloca en el analizador digital nCounter para la colección de datos. Cada molécula blanco de interés se identifica mediante el "código de color" generado por seis puntos fluorescentes ordenados presentes en su sonda de marcación asociada. En ese momento se cuentan y tabulan las sondas de marcación de la superficie del cartucho correspondientes a cada molécula blanco y se procesan con el algoritmo (Figura 5).

Figura 5: recogida de datos

Código	Gen	Recuento
XXXXXX	x	3
XXXXXX	y	1
XXXXXX	z	2

## 2.2 Principios del algoritmo Prosigna para el cálculo de resultados

La prueba se basa en el algoritmo clasificador de los 50 genes marcados, llamado anteriormente PAM50<sup>2</sup>, y se realiza en el sistema de análisis nCounter Dx utilizando ARN extraído de muestras de tejido de tumor de mama fijado en formaldehído y embebido en parafina (FFPE). El algoritmo utiliza un perfil de expresión de 50 genes para clasificar el cáncer de mama dentro de una de las cuatro clases moleculares o subtipos intrínsecos siguientes: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido o de tipo basal. Los perfiles de expresión génica prototípicos (p. ej., control) de los cuatro subtipos intrínsecos se configuraron en el sistema de análisis nCounter utilizando muestras de tumor de mama FFPE recogidas en múltiples centros clínicos de América del Norte. Tras realizar la prueba en una muestra de prueba del paciente, un algoritmo computacional basado en la correlación de Pearson compara el perfil de expresión de 50 genes normalizados de la muestra de prueba del paciente con los perfiles de expresión prototípicos de los cuatro subtipos intrínsecos de cáncer de mama. A la muestra de prueba del paciente se le asigna el subtipo con la correlación de Pearson más alta.

El algoritmo indica el riesgo de recurrencia (ROR) en una escala de 0 a 100<sup>3</sup>, correlativo a la probabilidad de recurrencia a distancia a los diez años para mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos en las primeras fases<sup>4</sup>. El informe también indica una categoría de riesgo (bajo, intermedio o alto). El ROR se calcula utilizando coeficientes de un modelo de Cox que incluye la correlación de Pearson con un subconjunto de 46 genes de los 50 genes utilizados para calcular cada centropide de subtipo intrínseco, un índice de proliferación y el tamaño del tumor. Las variables de la prueba se multiplican por los coeficientes correspondientes del modelo de Cox para generar el índice, que se ajusta a una escala de 0 a 100 basada en coeficientes generados a partir del conjunto de formación de muestras de tumor de mama FFPE. También se indican las categorías de riesgo basándose en valores de referencia de ROR determinados en un estudio de validación clínica.

## 3 REACTIVOS Y EQUIPO FACILITADOS

### 3.1 Descripción general del kit Prosigna

El kit Prosigna contiene reactivos suficientes para procesar 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30 o 40 muestras de pacientes, dependiendo del producto solicitado. Vea más abajo la información sobre pedidos. El kit Prosigna contiene un CodeSet, un tubo de referencia samples (muestras de referencia) para cada conjunto de una a diez pruebas, y componentes consumibles, cuyo rendimiento conjunto se prueba antes de su envío.

Número de catálogo	Número de pruebas del kit	Números de muestras de referencia incluidas
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2
PROSIGNA-020	20	4
PROSIGNA-030	30	6
PROSIGNA-040	40	8

Uso recomendado con el kit de aislamiento de ARN FFPE<sup>2</sup> Roche (Roche-FFPET-025 disponible solo a través de NanoString Technologies)

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.





### 3.2 Prosigna Kit Contents for a 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30, or 40 test Prosigna Kit

Number of Tests	1	2	3	4	10	20	30	40
<b>Prosigna CodeSet Box</b>								
Prosigna Reporter CodeSet	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	2 x 65 µL	3 x 65 µL	4 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	2 x 70 µL	3 x 70 µL	4 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	2 x 30 µL	3 x 30 µL	4 x 30 µL
CodeSet Barcode Sticker	1	1	1	1	1	2	3	4
Test Configuration Code	1	1	1	1	1	2	3	4
<b>Prosigna Prep Plate Box</b>								
Prep Plates	1	1	1	1	1	2	3	4
<b>Prosigna Cartridge Box</b>								
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1	2	3	4
<b>Prosigna Prep Pack Box</b>								
nCounter Prep Station Tips	1	1	1	1	1	2	3	4
nCounter Cartridge Adhesive Cover	2	2	2	2	2	4	6	8
nCounter Tip Sheaths	2	2	2	2	2	4	6	8
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	2 x 580 µL	3 x 580 µL	4 x 580 µL
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4	8	12	16
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4	8	12	16

#### Contents Description

Prosigna CodeSet	
Prosigna Reporter CodeSet	buffer, nucleic acids with fluorescent dyes
Prosigna Capture ProbeSet	buffer, nucleic acids
Prosigna RNA Reference Sample	buffer, nucleic acids
CodeSet Barcode Sticker	sticker sheet
Test Configuration Code	card with sticker
Prosigna Prep Plates	
Prep Plates	superparamagnetic beads, buffer, salts, oligonucleotides, polystyrene beads containing fluorescent dyes
Prosigna Cartridges	
nCounter Cartridge(s)	sample cartridge(s)
Prosigna Prep Pack	
nCounter Hybridization Buffer	buffer, salts
12-Well Notched Strip Tubes	plastic strips
12-Well Notched Strip Tube Lids	plastic lids
nCounter Prep Station Tips	2 pieces of 90 tips + 6 pieces nCounter adhesive films
nCounter Cartridge Adhesive Cover	6-well tip holders
nCounter Tip Sheaths	

#### 4 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso en diagnóstico *in vitro*.
2. Esta prueba debe ser realizada por operadores con formación en técnicas de biología molecular altamente complejas, de acuerdo con las normativas locales.
3. No mezcle componentes de kits de distintos lotes Prosigna. La funcionalidad de los lotes de kits Prosigna solo se puede garantizar si se utilizan tal como se suministran, pues así se estipula durante la fabricación.
4. No deben reutilizarse restos de reactivos en la prueba Prosigna.
5. Descarte las reacciones con temperaturas o tiempos de hibridación problemáticos.
6. Es importante mantener la integridad de la cadena de custodia de la muestra (del tejido al ARN y del ARN a la prueba) para garantizar que el ID de la muestra del paciente esté asociado con el resultado de la prueba correcta.
7. Si no se almacenan los reactivos en las condiciones indicadas en la etiqueta, el resultado de la prueba puede verse afectado negativamente.
8. Utilice siempre guantes para manipular los reactivos y las muestras.
9. Evite la contaminación con RNasa, que puede afectar negativamente a la calidad de los resultados.

2015-01 LBL-10010-02

Dra. SILVANA PINELA  
DIRECTORA CLÍNICA  
M.N. 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Rodríguez  
BioSystems S.A.

10. Todos los materiales y especímenes biológicos deben manipularse de forma segura si existiera la posibilidad de transmitir agentes infecciosos, y deben eliminarse adoptando las precauciones adecuadas de acuerdo con las normativas estatales, autonómicas y locales.
11. Nunca pipeteo con la boca.
12. Evite el contacto del reactivo con los ojos, la piel y las mucosas.
13. Utilice las prácticas recomendadas en los laboratorios moleculares para evitar la contaminación cruzada entre muestras de prueba o con blancos ácidos nucleicos de alta concentración (sintéticos o amplificados por PCR), que podría afectar negativamente a la calidad de los resultados.
14. Tras el procesamiento se encuentran niveles muy bajos de azida de sodio (<0,1 %) en los Cartridges (cartuchos) nCounter y las placas de preparación Prosigna; por lo tanto, se recomienda utilizar recipientes para residuos plásticos (no metálicos) para su eliminación. Aunque las probabilidades de que esto suceda con Prosigna son muy bajas, la acumulación de azida de sodio en el metal puede causar explosiones.
15. Puede obtener información adicional sobre la eliminación de instrumentos específicos en el manual de usuario del sistema de análisis nCounter Dx y en los manuales de mantenimiento de la estación de preparación y el analizador digital.
16. Puede consultar la ficha de datos de seguridad del CodeSet de marcación, el ProbeSet de captura, el buffer de hibridación y las placas de preparación en [www.prosigna.com](http://www.prosigna.com).
17. Todos los materiales peligrosos deben eliminarse de acuerdo con las directrices de eliminación de residuos peligrosos de su institución.
18. Los CodeSets que no se utilicen deben desecharse.
19. Si la categoría correspondiente al tamaño del tumor de un paciente se introduce de forma incorrecta en el software, el ROR y la clasificación del riesgo pueden verse negativamente afectados (p. ej., ROR distinto o error de clasificación).
20. Si el estado de los nodos de un paciente se introduce de forma incorrecta en el software, los resultados de las pruebas del paciente pueden ser incorrectos (p. ej., clasificación incorrecta del riesgo).
21. No utilice ARN con una calidad o cantidad insuficientes ni muestras tumorales con un área de superficie tumoral o una celularidad insuficientes en la prueba Prosigna. Es posible que la prueba Prosigna no pueda proporcionar un resultado válido e informe sobre un error.

#### 5 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PRUEBA

1. La prueba debe utilizarse únicamente con especímenes de tejido de cáncer de mama fijado en formaldehído y embebido en parafina (FFPE) procedentes de resección quirúrgica, no debe utilizarse en tejido de cáncer que no sea de mama, congelado o fresco.
2. Debe conocer el tamaño bruto del tumor primario y el estado de los nodos de un paciente para realizar la prueba.
3. Utilice puntas de micropipeta desechables estériles para evitar la contaminación microbiana y por nucleasa de los reactivos o las muestras durante el procesamiento.
4. Mantenga las muestras de ARN aisladas en hielo húmedo cuando no las esté manipulando activamente.
5. Se necesitan termómetros calibrados para las incubadoras y los bloques de calor.
6. No utilice los componentes del kit si están dañados.
7. Se recomienda a los laboratorios que realizan la prueba Prosigna que desarrollen y utilicen controles clínicos (por ejemplo, para la categoría de riesgo) con el fin de garantizar la precisión de los resultados con el paso del tiempo como parte de los procedimientos habituales de control de calidad de los laboratorios.

##### 5.1 Procesamiento de tejidos

1. Si no se elimina convenientemente el tejido normal tumoral circundante mediante macrodissección durante el procesamiento del tejido, podría infravalorarse el riesgo al comunicarse un ROR inferior al médico.
2. Si no se elimina convenientemente el ADN genómico humano durante el aislamiento del ARN podría aumentar el índice de error debido a una señal más débil en la prueba, o sobervalorarse el riesgo al comunicarse un ROR superior al médico.
3. Todas las secciones histológicas sin teñir deben colocarse sobre portaobjetos con carga positiva para evitar que se muevan durante el procesamiento del tejido.
4. Si el espécimen necesita varios portaobjetos, todos los portaobjetos deben procesarse juntos.
5. Las secciones histológicas colocadas sobre portaobjetos pueden degradarse si se almacenan durante más de nueve meses en un entorno desecado.



6. Sustituya la solución de trabajo de glicerol al 3 % todas las semanas, e si la solución se enturbia, para evitar la contaminación.
7. Cambie el contenido del primer lavado con D-limoneno tras procesar cuatro conjuntos de portaobjetos, y el contenido del segundo plato de tinte de D-limoneno y etanol (EtOH) tras procesar ocho conjuntos de portaobjetos para no poner en peligro la calidad del tejido.
8. Tenga cuidado al perfilar el área del tumor en el portaobjetos sin teñir y al eliminar el tejido no tumoral para garantizar que no se daña el tejido tumoral.
9. Tenga cuidado con los fillos durante la macrodissección.
10. Utilice una cuchilla nueva para cada muestra de tejido procesada.
11. El SDS al 10 % se precipita con frecuencia a temperatura ambiente y debe calentarse a 37 °C hasta que el precipitado se haya disuelto.
12. Debe comprobarse que los nuevos lotes de kits de aislamiento de ARN cumplan las especificaciones de los kits de aislamiento antes de aceptar los nuevos lotes de kits para realizar pruebas al paciente (consulte la sección 11.5 para obtener información detallada).

5.2 Cómo realizar la prueba Prosigna

1. Asegúrese de que el tamaño bruto del tumor primario categórico del paciente se haya introducido correctamente en el software.
2. Asegúrese de que el estado de los nodos categóricos del paciente se haya introducido correctamente en el software.
3. Compruebe que el bloque de calor con tapa térmica necesario para la hibridación cumpla las especificaciones y se haya calibrado.
4. Utilice solamente los consumibles incluidos en el kit Prosigna. Están específicamente diseñados para ser utilizados con la estación de preparación nCounter y el analizador digital nCounter.
5. Si el buffer de hibridación se ha almacenado a temperaturas bajas y se observa un precipitado, caliente los tubos a 37 °C hasta que se disuelvan las sales.
6. No remueva los componentes de la prueba vigorosamente para mezclarlos, pues podría dañar los reactivos. La mezcla debe realizarse con una pipeta.
7. No centrifugue el CodeSet de marcación a más de 3000 x g durante más de 10 segundos. No utilice la opción de "impulso" para centrifugar. Si lo hace el CodeSet podría precipitarse.
8. Mantenga las reacciones de hibridación a 65 °C hasta que estén listas para ser transferidas a la estación de preparación. Configurar el bloque de calor para que baje a 4 °C o colocar las muestras en hielo al final de la hibridación podría causar hibridación cruzada, lo que puede afectar negativamente los resultados de la prueba.
9. Si no se colocan los tubos de tira a 65 °C en un plazo de 15 minutos tras añadir el ProbeSet de captura, podría producirse hibridación cruzada, lo que puede afectar negativamente a los resultados de la prueba.
10. Si no se inicia el procesamiento de la estación de preparación en un plazo de 15 minutos desde que las muestras dejan de estar a 65 °C, podría producirse hibridación cruzada, lo que puede afectar negativamente a los resultados de la prueba.
11. Asegúrese de que las tapas de los tubos de tira estén firmemente selladas antes de la hibridación en el bloque de calor para evitar la evaporación, que podría afectar negativamente a los resultados de la prueba.

6 INFORMACIÓN SOBRE FORMACIÓN

Esta prueba debe ser realizada por operadores profesionales con formación sobre técnicas de biología molecular altamente complejas, de acuerdo con las normativas locales. Póngase en contacto con NanoString para obtener información sobre formación específica para realizar la prueba Prosigna.

7 MANIPULACIÓN DE RESIDUOS

Consulte el manual de usuario del sistema de análisis nCounter Dx para obtener información detallada sobre la manipulación de residuos específica sobre los reactivos y los instrumentos que se utilizan en aplicaciones de diagnóstico in vitro.

8 ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN (REACTIVOS)

La fecha de caducidad de todos los componentes del kit de prueba se indica en la etiqueta de código de barras suministrada con la caja de CodeSet y en las etiquetas exteriores de la caja de todos los componentes Prosigna.

- Los componentes de la caja de CodeSet de Prosigna (CodeSet de marcación Prosigna, ProbeSet de captura Prosigna y muestra de referencia de ARN Prosigna) deben almacenarse a -80 °C o menos.
- Los Cartridges (cartuchos) nCounter deben almacenarse como máximo a -20 °C.
- Las Prep Plates (placas de preparación) nCounter deben almacenarse a 4 °C.

2015-01 LBL-10010-02

Dra. SIVIA YANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Poderado  
BioSystems S.A.

- Los componentes del Prep Pack (paquete de preparación) deben almacenarse a temperatura ambiente (15 °C-25 °C)

9 INSTRUMENTOS NECESARIOS PARA PROSIGNA

- Sistema de análisis nCounter Dx (número de catálogo NCT-SYST-Dx EU, NCT-SYST-FLEX EU) (incluye los dos instrumentos siguientes)
    - o Estación de preparación nCounter 5s (número de catálogo NCT-PREP-STATION-Dx)
    - o Analizador digital nCounter 5s (número de catálogo NCT-DIGITAL-ANALYZER-Dx)
- Consulte el manual de usuario del sistema de análisis nCounter Dx para obtener información adicional.

10 REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS Y NO INCLUIDOS

10.1 Materiales

1. Kit de aislamiento de ARN FFPE (consulte la Sección 11.5 para conocer los requisitos del kit de aislamiento si no utiliza el kit de aislamiento de ARN FFPE T Rocha adquirido a través de NanoString Technologies)
2. Hematoxilina y eosina (H&E)
3. Portaobjetos de cristal con carga positiva
4. Agente aclarante de D-limoneno (grado histológico)
5. Etanol al 100 % (absoluto), grado ACS o equivalente (como mínimo el 99,5 %)
6. Glicerol, grado de biología molecular
7. Agua sin nucleasa, grado de biología molecular
8. SDS al 10 %, grado de biología molecular
9. Cuchillas (o escalpelos de echables)
10. Cuchillas desechables para microtomo
11. Tubos de microcentrifuga sin RNAse y antiadherentes de 1,5 o 1,7 mL y con tapón de rosca de 0,5 mL
12. Puntas de micropipeta sin RNAse con barrera de aerosol

10.2 Equipo

1. Microtomo
2. Baño María (40 °C)
3. Calentador de portaobjetos (45 °C)
4. Gradilla de secado para portaobjetos
5. Micropipetas, 2 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
6. Minicentrífuga con rotor de tubos de 0,2 mL y rotor de tubos de microcentrifuga estándar de 1,5/2,0 mL
7. Microcentrifuga de mesa estándar con rotor de ángulo fijo para tubos de centrifuga de 1,5 mL
8. Platos de tinte rectangulares de cristal con cubiertas (dimensiones interiores aproximadas de 3,6 x 2,8 x 2,4" (91 x 71 x 60 mm), se necesitan 3)
9. Gradilla de portaobjetos (con cubida para hasta diez portaobjetos de cristal de 3" x 1" (75 x 25 mm))
10. Bloque de calor seco, estacionario
11. Agitador vórtex de mesa para tubos de microcentrifuga
12. Probeta (tamaño sugerido: 100-250 mL)
13. Aguja de disección o pinzas para cubreobjetos de cristal (en ángulo, sin sierra)
14. Termómetros calibrados (que cubran un intervalo de 55 °C a 80 °C)
15. Espectrofotómetro UV/Vis para microvolúmenes (consulte a continuación las especificaciones)
16. Bloque de calor con tapa calentada (consulte a continuación las especificaciones)
17. Centrifuga con adaptador de micropipetas (consulte a continuación las especificaciones)
18. Jaira Coplin

10.3 Especificaciones de equipo

Tabla 1: espectrofotómetro UV/Vis para microvolúmenes de espectro completo para cuantificación de ácidos nucleicos

Característica de diseño	Especificaciones
Intervalo de volumen de muestras	1-2 µL
Longitud del recorrido	1 mm
Intervalo de longitud de onda	260-280 nm
Error o precisión de la longitud de onda	± 1 nm
Ancho de banda o resolución espectral	Menor o igual que 4 nm
Error fotométrico o precisión de la absorbancia	0,003 (recorrido de 1 mm)
Límite de detección	5 ng/µL ARN
Concentración máxima	> 1000 ng/µL ARN

6293



Tabla 2: espectrofotómetro UV-Vis de fotodiodos para microvolumenes para cuantificación de ácidos nucleicos

Característica de diseño	Especificaciones
Intervalo de volumen de muestras	1-2 µL
Longitud del recorrido	0,5 mm
Intervalo de longitud de onda	260 y 280 nm
Resolución espectral	Mínimo o igual que 8 nm
Precisión de la absorbanza	3 % (a 1,05 Abs a 260 nm)
Límite de detección	4 ng/µL ARN
Concentración máxima	> 1000 ng/µL ARN

Tabla 3: bloque de calor con tapa calefactada para hibridación de la prueba

Característica de diseño	Especificaciones
Diseño del bloque de calor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Debe ser apto para 12 tubos de tira estrados de perfil regular de 0,2 ml., incluidos en el paquete de preparación nCounter.</li> <li>Los bloques de calor diseñados para tubos de perfil bajo (LP) y perfil alto (HP) no son compatibles (denominados también bloques "réplicas" para termocicladores).</li> <li>Los bloques de calor diseñados para otros tipos de tubos (p. ej. tubos de 0,1 ml. o tubos de 1,6 ml.) no son compatibles.</li> <li>Deben ser programáticos para mantenerse a una temperatura de 65 °C.</li> <li>Deben mantener la temperatura a ± 1 °C de 65 °C.</li> </ul>
Diseño de la tapa calefactada	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se aceptan tapas de altura fija o ajustable.</li> <li>La tapa debe ser programable para mantenerse a una temperatura de 70 °C.</li> </ul>

Tabla 4: centrífuga con portador de microplacas para girar placas de preparación nCounter

Característica de diseño	Especificaciones
Velocidad de centrifugación	Mínimo de 2000 - g
Rotores	4 rotors fijas de 750 ml. con portadores de microplacas (o equivalentes) para rotar microplacas de 96 pozos con formato SBS.
Modos	Modos de aceleración/desaceleración

## 11 RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE ESPECÍMENES

### 11.1 Requisitos de especímenes de tejido y revisión patológica

- La prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama debe realizarse en un espécimen de tejido de tumor de mama fijado en formaldehído y embebido en parafina (FFPE) clasificado por un patólogo como uno de los siguientes tipos de carcinoma de mama invasivo:
  - Carcinoma ductal invasivo
  - Carcinoma lobulillar invasivo
  - Carcinoma invasivo con características ductales y lobulillares ("carcinoma de tipo mixto")
  - Sin ningún tipo especial (NST) o no especificado (NOS)
- Un patólogo debe seleccionar el bloque tumoral FFPE con la mayor área de carcinoma de mama invasivo viable para esta prueba.
- En la prueba deben procesarse secciones histológicas colocadas sobre portaobjetos sin teñir y es necesario un portaobjetos correspondiente teñido con H&E procedente del bloque tumoral FFPE.
- Se recomienda que las secciones histológicas que se vayan a procesar en la prueba se corten de la zona que contiene la sección histológica cortada para la tinción con H&E, para garantizar que el área tumoral identificada en el portaobjetos teñido con H&E sea representativa del área tumoral analizada en los portaobjetos sin teñir.
- Un patólogo debe marcar con un círculo la región del carcinoma de mama invasivo viable en el portaobjetos con H&E, excluyendo el tejido no tumoral circundante.
- Un patólogo o técnico de laboratorio cualificado deben calcular la celularidad del tumor y el área de la superficie tumoral que se encuentran dentro del círculo en el portaobjetos teñido con H&E.
  - El porcentaje de celularidad del tumor del portaobjetos teñido con H&E debe ser > 10 %
  - El área de la superficie tumoral marcada con el círculo en el portaobjetos teñido con H&E debe ser ≥ 4 mm<sup>2</sup>
- Se recomienda contar con un área de superficie tumoral total de más de 100 mm<sup>2</sup> para la prueba. La siguiente tabla ilustra el número de portaobjetos recomendado según el área de la superficie tumoral medida en el portaobjetos teñido con H&E.

- Si en el proceso de revisión del tejido se detecta que el bloque tumoral no tiene área tumoral suficiente o celularidad tumoral suficiente, debe evaluarse un bloque diferente del mismo tumor. Si no hay bloques FFPE que contengan suficiente tejido tumoral, no debe realizarse la prueba Prosigna. Tenga en cuenta que en el caso de los tumores con menos de 20 mm<sup>2</sup> de área de superficie, es más probable que no se cumplan los requisitos de utilización de ARN.

Tabla 5: portaobjetos recomendados según área de la superficie tumoral

Área de superficie tumoral medida en portaobjetos teñido con H&E (mm <sup>2</sup> )	Número de portaobjetos sin teñir
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

### 11.2 Recogida y procesamiento de especímenes

- Lo siguiente puede realizarse de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del laboratorio: recogida de tejido y fijación en formaldehído, manipulación y almacenamiento de bloques tumorales FFPE y envío del tejido FFPE colocado en portaobjetos.
- Las secciones histológicas FFPE colocadas en portaobjetos deben almacenarse de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del laboratorio. Si el almacenamiento se va a prolongar durante períodos de mayor duración (> 30 días), los portaobjetos deben almacenarse en un entorno desecado y procesarse en un plazo de 8 meses para garantizar la calidad de los resultados de la prueba.

### 11.3 Preparación de portaobjetos

- Utilizando un microtomo, corte una sección de 4-5 µm de grosor para teñir con H&E.
- Utilizando un microtomo, corte secciones de 10 µm de grosor para utilizar en la prueba Prosigna.
- Sumerja las secciones en un baño María a 40 °C.
- Coloque las secciones sobre portaobjetos de cristal con carga positiva.
- Espera a que los portaobjetos se sequen.
- Caliente los portaobjetos durante la noche a 45 °C.

### 11.4 Procesamiento de portaobjetos

- Prepáre una solución de trabajo de glicerol al 3 % mezclando 1,5 ml de glicerol con 48,5 ml de agua sin nucleos de grado molecular; utilice la escala conveniente. Vierta la solución en una jarra Coplin para procesar portaobjetos.
- Vierta aproximadamente 200-250 mL de agente aclarante de D-limoneno en dos platos de tintura, asegurándose de que los portaobjetos del soporte de portaobjetos estén completamente sumergidos.
- Vierta aproximadamente 200-250 ml de etanol absoluto (EtOH) en un tercer plato de tintura.
- Coloque la(s) sección (secciones) histológica(s) colocada(s) en el (los) portaobjetos sin teñir en un soporte para portaobjetos.
- Coloque el soporte de portaobjetos en el primer plato de tintura con D-limoneno y agite suavemente el soporte de portaobjetos hacia atrás y hacia adelante durante 10-15 segundos. Deje el soporte en el primer plato de tintura con D-limoneno durante un tiempo total de 2 minutos.
- Pase el soporte de portaobjetos del primer plato de tintura con D-limoneno al segundo plato de D-limoneno. Agite suavemente el soporte de portaobjetos hacia atrás y hacia adelante durante 10-15 segundos. Deje el soporte de portaobjetos en el segundo plato de tintura con D-limoneno durante un tiempo total de 2 minutos. Asegúrese de que se haya eliminado toda la parafina; si no fuera así, deje el soporte en el segundo plato de tintura con D-limoneno un minuto más, aproximadamente.
- Pase el soporte de portaobjetos del segundo plato de tintura con D-limoneno al lavado de EtOH. Agite suavemente el soporte de portaobjetos hacia atrás y hacia adelante durante 10-15 segundos y retírelo una vez transcurridos 2 minutos.
- Espera 5-10 minutos o hasta que los portaobjetos se sequen completamente y el tejido esté blanco (puede llevar más tiempo, dependiendo del tamaño del tejido).
- Perfina el área del tumor en la parte posterior del (de los) portaobjeto(s) sin teñir alineándolos con el correspondiente portaobjetos teñido con H&E y transponiendo el área perfurada.
- Trabaje con un portaobjetos cada vez, sellando el tejido del portaobjetos sin teñir perfurado sumergiendo el portaobjetos en una solución de glicerol al 3 %.
- Elimine el glicerol sobrante del portaobjetos con una gasa de laboratorio.
- Al procesar varios portaobjetos, el usuario puede dejar que los portaobjetos se sequen en una grámula de secado mientras exhibita los demás portaobjetos.

6293



- 13 Raspe el tejido no tumoral que rodea el área del tumor perforada con una cuchilla e un escalpelo y deséchelo.
- 14 Sosteniendo un extremo del portaobjetos y apoyando el otro extremo sobre una superficie sólida en un ángulo de 45 grados, recoja el tejido tumoral macrodisseccionado en el filo de una cuchilla. El tejido debería 'subirse' fácilmente a la cuchilla al recogerlo.
- 15 Repita el paso anterior para cada portaobjetos del mismo espécimen.
- Nota: pueden recogerse varios portaobjetos sin teñir de un solo espécimen FFPE en la misma cuchilla.
- 16 Pase con cuidado las secciones histológicas del mismo espécimen a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.
- 17 Si lo utiliza, limpie la aguja de disección o las pinzas sumergiéndolas en D-limoneno durante unos segundos y secándolas entre la recogida de una muestra de tejido y la siguiente.

**Aislamiento de ARN**

1. Inspeccione visualmente los tubos de muestra para determinar si el tejido se ha digerido por completo. La digestión completa se aclarará y mostrará poco o ningún tejido en la solución.
  - a. Si la digestión ha finalizado, continúe con el siguiente paso;
  - b. Si la digestión no se ha completado, añada 20 µL de proteinasa K adicional e incube durante una hora más.
- 2 Gire brevemente todas las muestras (< 30 segundos en una minicentrífuga).
- 3 Incube las muestras a 80 °C durante 15 minutos.
- 4 Prepare o descongele una cantidad suficiente de alícuotas de DNasa. Una vez descongeladas, guarde las alícuotas en hielo hasta que estén listas para utilizar.

Nota: 50 µL de alícuotas DNasa contienen suficiente DNasa para 4 aislamientos de ARN.

- 5 Diluya la DNasa en buffer de incubación de DNasa (DIB). El número necesario (N) de aislamientos de ARN es: (N+1) x 90 µL de buffer de incubación de DNasa + (N+1) x 10 µL de DNasa. Guarde la solución de DNasa diluida en hielo hasta que esté lista para utilizarse.
- 6 Añada 325 µL de buffer de fijación de parafina (PBB) y 325 µL de etanol absoluto a cada muestra y mezcle pipeteando.
- 7 Gire brevemente (< 30 segundos en una minicentrífuga).
- 8 Coloque un tubo de filtrado de alta pureza en un tubo de recogida de alta pureza.
- 9 Pipetee la muestra en el depósito superior del tubo de filtrado, evitando el tejido residual.
- 10 Centrifugue durante 30 segundos a 6000 x g.
- 11 Coloque el tubo de filtrado de alta pureza en un nuevo tubo de recogida de alta pureza (deseche el tubo de recogida antiguo que contiene el flujo).
- 12 Centrifugue durante 2 minutos a 16 000 x g para secar por completo la lana del filtro.
- 13 Coloque el tubo de filtrado de alta pureza en un nuevo tubo de recogida de alta pureza (deseche el tubo de recogida antiguo que contiene el flujo).
- 14 Añada 100 µL de solución de DNasa diluida a la lana del filtro del tubo de filtrado de alta pureza e incube durante 15 minutos a una temperatura de entre +15 y +25 °C.
- 15 Añada 500 µL de solución de trabajo de buffer de lavado I (WB1) a la lana del filtro de alta pureza, centrifugue durante 20-30 segundos a 6000 x g y deseche el flujo.
- 16 Añada 500 µL de solución de trabajo de buffer de lavado II (WB2) a la lana del filtro de alta pureza, centrifugue durante 20-30 segundos a 6000 x g y deseche el flujo.
- 17 Añada 500 µL de solución de trabajo de buffer de lavado III (WB3) a la lana del filtro de alta pureza, centrifugue durante 20-30 segundos a 6000 x g y deseche el flujo.
- 18 Centrifugue durante 2 minutos a 16 000 x g para secar por completo la lana del filtro.
- 19 Coloque el tubo de filtrado de alta pureza en un tubo de microcentrifuga de 1,5 o 1,7 mL sin RNasa.
- 20 Añada 30 µL de buffer de elución (EB) al centro de la lana del filtro de alta pureza.
- 21 Incube durante 1 minuto a una temperatura de entre +15 y +25 °C.
- 22 Centrifugue durante 1 minuto a 6000 x g para eludir el ARN de la columna. Quite y deseche el tubo del filtro de alta pureza.
- 23 Centrifugue el ARN eludido en el tubo de microcentrifuga durante 2 minutos a la velocidad máxima.
- 24 Transfiera el sobrenadante a un tubo con tapón de rosca de 0,5 mL sin dañar las fibras de vidrio que puedan haberse caído al lavar la lana del filtro en la parte inferior del tubo original.
- 25 Mida la concentración de ARN aislado el mismo día de trabajo (almacene a una temperatura de entre +2 y +8 °C) o congélela a -70 °C o menos hasta que vaya a utilizarse.

**11.5 Aislamiento de ARN**

NanoString recomienda el uso del kit de aislamiento de ARN FFPE Roche, que ha sido validado específicamente para su uso con Prosigna.

Es posible utilizar otros kits de aislamiento de ARN para preparar muestras para Prosigna si ofrecen ARN de secciones histológicas de tumor de mama FFPE colocadas sobre portaobjetos que cumple con las siguientes especificaciones:

Tabla 5: especificaciones del kit de aislamiento de ARN

Parámetro	Prueba o medición	Especificación
Concentración de ARN	Densidad óptica a 260 nm	> 12,6 ng/µL
Volumen total de ARN (µL)	Volumen eluido total	> 12 µL
Pureza del ARN	Ratio desde densidad óptica a 260 nm hasta densidad óptica a 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
Contaminación del ADN	Contenido de ADN genómico en la muestra de ARN eluida	< 1 ng/µL
Integridad del ARN	Distribución del tamaño de los fragmentos de ARN aislados	> 90 % de los fragmentos de ARN aislados deben tener > 100 nucleótidos de longitud

**Procedimiento de aislamiento de ARN:**

Aísla ARN del tejido tumoral macrodisseccionado según las instrucciones del fabricante si utiliza un kit que no sea el kit de aislamiento de ARN FFPE Roche. Las siguientes instrucciones pertenecen al kit de aislamiento de ARN FFPE Roche recomendado para su uso con Prosigna. Consulte el prospecto del kit de aislamiento de ARN FFPE Roche para conocer el contenido y las instrucciones de almacenamiento, seguridad y manipulación.

**Preparación de soluciones de trabajo**

1. Prepare las soluciones de trabajo antes de continuar con la digestión de tejidos y el aislamiento de ARN.

Reactivo	Procedimiento
Buffer de lavado I (WB1)*	Añadir 15 mL de etanol al 100 %, almacenar el WB1 preparado a una temperatura de entre +15 y +25 °C.
Buffer de lavado II (WB2)*	Añadir 80 mL de etanol al 100 %, almacenar el WB2 preparado a una temperatura de entre +15 y +25 °C.
Proteinasa K (PK)	Disolver la proteinasa K liofilizada en buffer de preparación de reactivos (RPB) de 4,5 mL. Preparar 600 µL de alícuotas, etiquetar y almacenar las alícuotas a una temperatura de entre -15 y -25 °C.
DNasa I (DNasa I)*	Disolver la DNasa I liofilizada en buffer de preparación de reactivos (RPB) de 740 µL. Preparar 50 µL de alícuotas, etiquetar y almacenar las alícuotas a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Nota: los elementos marcados con un asterisco (\*) no son necesarios hasta que se haya digerido el tejido

**Digestión del tejido**

1. Descongele una cantidad suficiente de alícuotas de proteinasa K (PK). Una vez descongeladas, guarde las alícuotas en hielo hasta que estén listas para utilizar.  
Nota: 600 µL de alícuotas PK contienen suficiente proteinasa K para 4 digestiones de tejido.
2. Añada 100 µL de buffer de lisis de tejido (TLB), 16 µL de SDS al 10 % y 120 µL de solución de trabajo de proteinasa K a los tubos de muestra con tejido.
3. Remueva los tubos de muestra con tejido durante varios segundos y gírelos brevemente.
4. Incube a 55 °C durante la noche (entre 12 y 23 horas).

**11.6 Mida la calidad y la concentración del ARN**

- 1 Mida la densidad óptica (OD) a 260 y 280 nm de 2 µL del ARN aislado utilizando un espectrofotómetro que cumpla las especificaciones de líneas, indicadas en 10.3 Especificaciones del equipo. Evite pipetear el volumen de 2 µL de la parte inferior del tubo original en el caso de que queden fibras de vidrio, ya que esto afectará a la lectura de la densidad óptica.
- 2 Sigá las instrucciones del fabricante del espectrofotómetro para medir ARN.
- 3 Si alguna muestra no cumple los parámetros mínimos de concentración o pureza del ARN (Tabla 6), centrifugue el tubo de muestra durante 1 minuto a velocidad máxima (> 10 000 x g), coloque el tubo en hielo y repita el proceso de medición. Si la muestra continúa sin cumplir el parámetro de concentración o pureza, la muestra de ARN no es adecuada para el análisis siguiendo el procedimiento de la prueba Prosigna. No utilice ARN de cantidad o calidad insuficientes en la prueba Prosigna.

*[Handwritten signature]*

Dra. SILVINA MANELA  
DIRECTORA CLÍNICA  
BIOGEN SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Asesorado  
BIOGEN SYSTEMS S.A.

4. Puede repetirse la extracción de ARN si se cumplen las especificaciones de pureza mínima o concentración mínima (Tabla 6). Los usuarios pueden aislar por objetos adicionales del mismo bloque FFPE o elegir un bloque independiente del mismo paciente.
5. Si la concentración de ARN supera los 250 ng/μL, debe diluirse con agua sin DNasa y sin RNasa de grado molecular hasta alcanzar una concentración blanco de 200 ng/μL antes de realizar la prueba de hibridación downstream. Utilice el resultado de la ratio de OD 260/280 registrada de la muestra no diluida para determinar si la muestra diluida cumple la pureza mínima del ARN de 1,7.
6. Congele el ARN a -70 °C como mínimo si la prueba Prosigna no puede completarse en el mismo día de trabajo.

### 11.7 Procedimiento de la prueba

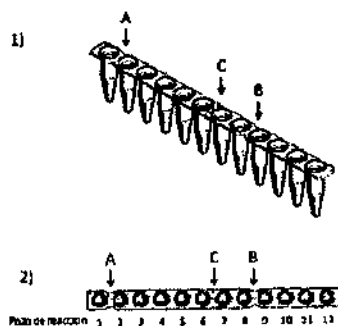
Este procedimiento de la prueba describe los pasos necesarios para realizar la prueba Prosigna utilizando el sistema de análisis nCounter Dx de NanoString. Estos pasos pueden resumirse en las siguientes categorías en dos días consecutivos:

- Día uno**
- Configuración del registro de la identificación de la serie de ciclos (RSID) en la aplicación web
  - Configuración de la hibridación de ARN con el CodeSet Prosigna (30 min de configuración, 15-21 h de hibridación)
- Día dos**
- Configuración y utilización de la estación de preparación (20 minutos de configuración, 2-3 horas por ciclo, en función del número de muestras utilizadas)
  - Configuración y escaneo de cartuchos en el analizador digital (5 minutos de configuración, 2,5-4,5 horas por cartucho, en función del número de muestras utilizadas)
  - Informe de recuperación (30 minutos)

#### Selección de muestras del paciente y configuración de lotes

1. Determine qué muestras del paciente formarán parte del ciclo de prueba. Pueden incluirse hasta diez muestras en un solo lote.
  - a. A cada muestra del lote se le asignará una posición única en un tubo de tira de 12 pozos utilizado para la hibridación, que se registrará como parte del ID de serie de ciclos en el instrumento (el ID de serie de ciclos se obtiene mediante software de aplicaciones web). Tenga en cuenta que las posiciones 1 y 2 están reservadas para la muestra de referencia, y que las posiciones 3-12 son para muestras de ARN tumorales.
  - b. La siguiente ilustración muestra las vistas lateral 1) y superior 2) del tubo de tira. Los tubos de tira están estriados asimétricamente entre los pozos de reacción 1 y 2 (A) y 8 y 9 (B) para contribuir a mantener el orden de las muestras durante el procesamiento. Además, los tubos de tira tienen muescas entre los pozos de reacción 6 y 7 (C) para facilitar el corte del tubo de tira si es necesario para dar cabida a adaptadores de centrifuga estándar.

Figura 6: Ilustración de tubos de tira estriados



2. Calcule la cantidad de ARN y agua (si es necesario) que deben añadirse a la reacción de hibridación para cada muestra del lote.
  - a. Se recomienda utilizar 250 ng de ARN para la prueba. El intervalo de cantidad de ARN aceptable para la hibridación es 125-500 ng.
  - b. Calcule el volumen (en microlitros) de muestra de ARN que debe añadirse a la reacción de hibridación dividiendo la cantidad de muestra deseada (p. ej., 250 ng) entre la concentración medida.
  - c. Si la concentración calculada de la muestra está entre 12,5 ng/μL y 25 ng/μL, añada un volumen máximo de 10 μL.

*[Firma manuscrita]*

2015-01 LBL-10010-02

Dra. Silvia Daniela  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
M.N. 14.424  
BIO SYSTEMS S.A.

4. Para muestras que requieran menos de 10 μL, calcule el volumen de agua necesario para generar un volumen de muestra de 10 μL.

**Ejemplo:** para una muestra con una concentración de ARN medida de 85 ng/μL, se necesitan 2,9 μL de muestra para una masa total de 250 ng y se necesitan 7,1 μL de agua para que el volumen llegue a 10 μL antes de añadir los reactivos restantes. En ecuación:  $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2,9 \mu\text{L}$ .

#### Procesamiento y registro de muestras

El usuario creará un ID de serie de ciclos único para cada lote de muestras asociando los ID de las muestras con la ubicación en el tubo de tira (posiciones 3-12) con la aplicación web de los servicios del sistema de análisis nCounter Dx. El usuario puede consultar el manual de usuario para obtener instrucciones sobre el uso de la aplicación web de los servicios del sistema de análisis nCounter Dx.

1. Si se congeló el ARN antes de su uso, siga estos pasos antes de continuar:
    - a. Descongele completamente las muestras de ARN y almacénalas en hielo.
    - b. Centrifugue el tubo de muestras descongelado durante 1 minuto a velocidad máxima ( $> 10\,000 \times g$ ) y devuélvalo al hielo.
  2. Elija el tamaño del kit de pruebas Prosigna adecuado según el número de muestras de pacientes sometidas a pruebas (1, 2, 3, 4 o 10). Extraiga un tubo de cada uno de los siguientes reactivos del kit CodeSet del congelador que está a -80 °C y descongélelo. Guarde los reactivos en hielo si no va a continuar de forma continua con los siguientes pasos.
    - a. CodeSet de marcación Prosigna (etiqueta verde en la tapa)
    - b. ProbeSet de captura Prosigna (etiqueta gris en la tapa)
    - c. Reference sample (Muestra de referencia) Prosigna (sin etiqueta en la tapa)
  3. Quite la etiqueta de código de barras de lote de CodeSet y un código de configuración de prueba de la caja de CodeSet.
  4. En un navegador web, inicie sesión en la aplicación web del sistema de análisis de diagnóstico in vitro nCounter Dx y seleccione Prosigna como tipo de prueba para comenzar a configurar los formularios de registro digital.
  5. En la página principal, seleccione "Create New Run Set" (Crear nueva serie de ciclos).
  6. El primer campo obligatorio para definir un ciclo Prosigna es el Run Set ID (ID de serie de ciclos). Introduzca un identificador único en el campo Run Set ID (ID de serie de ciclos) para identificar el lote de muestras.
  7. Escanee o introduzca de forma manual el código de configuración de prueba en la aplicación web. Una vez escaneado o introducido, podrá desecharse.
  8. Escanee o introduzca de forma manual el número de kit CodeSet en la aplicación web.
  9. A continuación, introduzca el ID de muestra único de la muestra que se colocará en la tercera posición/pozo del tubo de tira en el campo de ID de muestra correspondiente.
    - a. Introduzca los ID de muestras de ARN del paciente utilizando un escáner de códigos de barras o manualmente, introduciendo los ID de muestras con un teclado.
    - b. Tras introducir cada ID de muestra, pulse TAB para rellenar los campos desplegados obligatorios (tamaño bruto del tumor y estado de los nodos) correspondientes a la muestra antes de introducir la siguiente muestra.
      - i. Utilice el número de nodos positivos establecido durante la evaluación patológica del paciente para seleccionar la categoría de los nodos de la prueba (cero, 1-3, 2, 4).
      - ii. Utilice el tamaño bruto medido del tumor o la fase establecida durante la evaluación patológica del paciente para seleccionar la categoría de tamaño de tumor adecuada para la prueba ( $\leq 2 \text{ cm}$  o  $> 2 \text{ cm}$ ).
    - c. Puede introducir comentarios en el campo opcional Memo (Memorando) de cada muestra.
- Nota:** si no se requiere alguna posición/pozo de los tubos de tira, deje el resto de campos en blanco. Si se requieren campos adicionales para más muestras, utilice una configuración de prueba diferente que aloje más muestras.
10. Tras completar la introducción de muestras, especifique qué usuarios recibirán lo siguiente:
  - a. Actualizaciones de estado para los ciclos del analizador digital y la estación de preparación.
  - b. La notificación de que el informe final está disponible.
11. Guarde la serie de ciclos completada.
  - a. Puede imprimir y utilizar la hoja de cálculo de la serie de ciclos para la verificación y la trazabilidad de las muestras.

Lic. Alejandro Diez  
Asesorado  
BIO SYSTEMS S.A.



Procedimiento de reacción de hibridación

Nota: los siguientes pasos asumen diez (10) muestras de pacientes y dos (2) muestras de referencia.

Nota: No gire el CodeSet de marcación a más de 3000 x g ni durante más de 10 segundos, y no utilice "pulsaciones" para que gire. De lo contrario, la centrifuga alcanzará la velocidad máxima y podría hacer girar el CodeSet fuera de la solución.

1. Programe el bloque de calor utilizando un volumen de 30 µL, la temperatura calculada del bloque y la tapa y la configuración temporal "forever" (para siempre) (o una configuración temporal de mantenimiento equivalente). Establezca la temperatura del bloque de calor en 65 °C y la de la tapa calefactada, en 70 °C.

Nota: Para los siguientes pasos, es fundamental mantener el orden en el que se añaden las muestras al tubo de tira, asegurándose de que coincidan con el orden del ID de serie de ciclos.

2. Etiquete el tubo de tira estriado de 12 pozos suministrado para distinguir las posiciones 1-6 de las posiciones 7-12 (consulte la ilustración del tubo de tira).

3. En caso necesario, corte el tubo de tira por la mitad para que quepa en una minicentrífuga con un adaptador para tubos de tira

4. Pipeteo 10 µL de muestra de referencia en las posiciones 1 y 2 del tubo de tira estriado.

5. Pipeteo el volumen de agua calculado necesario para cada muestra en las posiciones correspondientes del tubo de tira estriado.

6. Pipeteo el volumen de ARN calculado necesario para cada muestra en la posición adecuada del tubo de tira estriado, utilizando una punta de pipeta nueva para cada muestra.

7. Una vez añadida la muestra del paciente al tubo de tira, se recomienda colocar el tubo de muestras en una gradilla para tubos de muestras, manteniendo el orden en el que se añadió la muestra al tubo de tira. Esto es para comprobar que las muestras se añadieron en el orden previsto una vez añadidas todas las muestras al tubo de tira.

8. Una vez añadidas todas las muestras al tubo de tira, compruebe que se haya mantenido el orden de las muestras en el tubo de tira (puede utilizarse la hoja de cálculo de la serie de ciclos para comprobar el orden de las muestras).

a. Si es necesario, edite el ID de serie de ciclos utilizando el software de la aplicación web para reflejar el orden de las muestras en la disposición final (consulte el manual de usuario del sistema de análisis nCounter Dx para obtener instrucciones sobre cómo editar un ID de serie de ciclos existente).

9. Una vez comprobado el orden de las muestras, coloque todos los tubos de las muestras de ARN en hielo.

10. Cree una mezcla maestra con 130 µL del buffer de hibridación y 85 µL del CodeSet de marcación.

Nota: si el CodeSet de marcación se guardó en hielo, deje que alcance la temperatura ambiente durante 1 minuto antes de añadir buffer de hibridación.

11. Mezcle pipeteando y gire brevemente la mezcla maestra. Nota: No añada el ProbeSet de captura a la mezcla maestra Y no almacene la mezcla maestra completada en hielo.

12. Pipeteo 15 µL de mezcla maestra en cada uno de los 12 pozos. Utilice una punta de pipeta nueva para cada pozo.

Nota: una vez realizado el siguiente paso, el tubo de tira debe colocarse en el bloque de calor a 65 °C en un plazo de 15 minutos.

13. Añada 5 µL de ProbeSet de captura a cada pozo utilizando una nueva punta de pipeta con cada pozo.

14. Tape los pozos de los tubos de tira y mezcle los reactivos invirtiendo el tubo de tira varias veces y dándole ligeros golpecitos con el dedo para garantizar una mezcla completa.

15. Gire brevemente las muestras en el tubo de tira en un sistema PicoFuge o en una microcentrifuga (a < 3000 x g).

Nota: utilice un sistema PicoFuge que pueda alojar un tubo de tira de 12 pozos, o en caso necesario, una microcentrifuga que pueda alojar tubos de tira cortados.

16. Coloque los tubos de tira en un bloque de calor de 65 °C con una tapa calefactada. Incube las pruebas de hibridación a 65 °C durante 15-21 horas. Las hibridaciones deben dejarse a 65 °C hasta que estén listas para procesarse en la estación de preparación.

Nota: descarte los CodeSets que no utilice.

Cómo procesar muestras en la estación de preparación nCounter

1. Localice la estación de preparación asociada con el analizador digital.

2. Retire el cartucho nCounter del almacenamiento a -20 °C y déjelo en la bolsa de aluminio 10-15 minutos para que alcance la temperatura ambiente.

Nota: asegúrese de utilizar los componentes del mismo lote del kit de forma conjunta.

3. Cuando el cartucho haya alcanzado la temperatura ambiente, retire el cartucho de la bolsa de aluminio antes de cargar el cartucho en la cubierta de la estación de preparación.

4. Retire las placas de preparación nCounter del almacenamiento a 4 °C y espere 10-15 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.

Nota: en los ciclos que utilizan un kit Prosigna de 1, 2, 3 o 4 pruebas solo se requiere una placa de preparación.

5. Centrifugue las placas de preparación a 2000 x g durante 2 minutos para acumular líquidos en la parte inferior de los pozos, antes de cargar las placas de preparación en la cubierta de la estación de preparación.

6. Mientras los cartuchos y las placas alcanzan la temperatura ambiente, prepare la estación de preparación con los consumibles del paquete de preparación nCounter.

7. Utilizando la estación de preparación nCounter, toque la interfaz de la pantalla y seleccione el botón "Diagnóstico" (Diagnóstico) de su prueba.

8. En la pantalla Main Menu (Menú principal), seleccione el botón "Process Samples" (Procesar muestras) en la interfaz de la pantalla táctil.

9. Examine la lista de ID de serie de ciclos (RSID) disponibles que aparece en pantalla para confirmar el RSID de las muestras que se están procesando en ese momento.

10. Seleccione el RSID tocando la pantalla y seleccione "Next" (Siguiente) en la interfaz de la pantalla táctil.

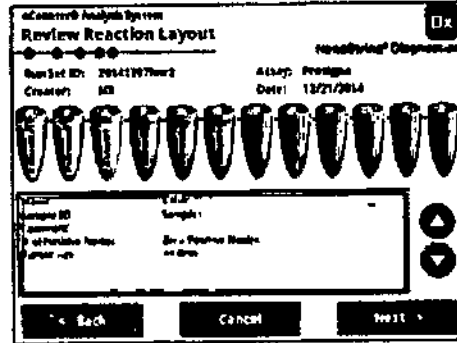
11. En la interfaz de la pantalla táctil, compruebe que se haya seleccionado el RSID correcto observando cada tubo de la pantalla y haciendo referencia cruzada a la información de la muestra.

a. Aquí puede utilizar la hoja de cálculo de la serie de ciclos para la verificación y la trazabilidad de las muestras

b. Si se seleccionó un RSID incorrecto, toque el botón "Back" (Atrás) y seleccione el RSID correcto.

c. Si el RSID era correcto pero hay errores de introducción de muestras, toque el botón "Back" (Atrás), vaya a una estación de trabajo informática y edite el RSID a través de la aplicación web.

Figura 7: pantalla Process a Run (procesar un ciclo) de la estación de preparación



12. En las siguientes pantallas se le pedirá que escanee los ID de los códigos de barras de los reactivos necesarios en los campos abiertos o que confirme la posición de los consumibles necesarios en la cubierta. Tras realizar cada tarea, seleccione "Next" (Siguiente) en la interfaz de la pantalla táctil para pasar a la siguiente instrucción.

Nota: en los ciclos que utilizan un kit Prosigna de 1, 2, 3 o 4 pruebas solo se requiere una placa de preparación y un tubo de tira de calentador vacío. En los ciclos que se realizan con el kit de 1, 2, 3 y 4 pruebas, cargue la placa de preparación y el tubo de tira de calentador vacío en sus respectivas posiciones delanteras (más cerca del usuario) en la cubierta de la estación de preparación.

13. Retire las muestras del bloque de calor.

Nota: inicie el ciclo de la estación de preparación como máximo 15 minutos después de haber extraído las muestras del bloque de calor.

14. Coloque los tubos de tira en un sistema PicoFuge o en una minicentrífuga y gire brevemente (a < 3000 x g).

15. Retire con cuidado los tapas del tubo del tubo de tira.

16. Las muestras del tubo de tira y las guías de la estación de preparación deberán mantener la orientación y el orden correctos de las muestras.

17. Coloque los tubos de tira con los pozos en orden del 1 al 12 de izquierda a derecha en la cubierta de la estación de preparación nCounter. Si realiza un ciclo utilizando un kit de 4 pruebas, solo deberá colocar la primera mitad del tubo de tira (pozos 1-6) en la parte izquierda del soporte de los tubos de muestras en la cubierta, si corresponde. Tenga en cuenta que es muy importante utilizar solo los pozos 1-6; la segunda mitad del tubo de tira (pozos 7-12) no cabrá en la mitad izquierda del soporte debido al diseño dentado del tubo.

18. Confirme que los tubos de tira estén firmemente asentados sobre la estación de preparación y cierre la tapa metálica.

Handwritten signature/initials.

2015-01 LBL-10010-02

Dra. SILVANA JANELA DIRECTORA TECNICA BIOSYSTEMS S.A.

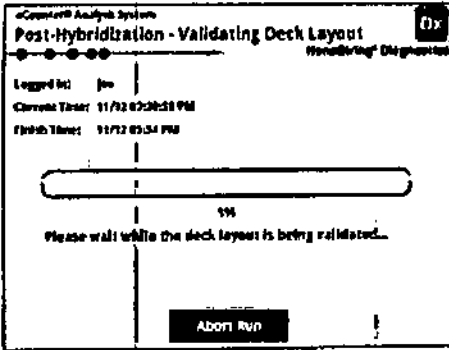
Lic. Alejandro Diez Gerente Operaciones BIOSYSTEMS S.A.

Handwritten signature/initials.



19. Si la tapa no cierra bien, se le pedirá que la cierre durante la validación de la disposición de la cubierta.
20. Seleccione "Next" (Siguiente) en la interfaz de la pantalla táctil.
21. Cierre la compuerta del instrumento cuando se le indique y seleccione "Next" (Siguiente) para comenzar la validación de la disposición de la cubierta.
22. Si se produce un error, siga las instrucciones asociadas al error específico para continuar con la validación de la disposición de la cubierta.

Figura 8: estación de preparación y validación de la disposición de la cubierta posthibridación



23. Una vez validada la disposición de la cubierta, seleccione "Start Processing" (Iniciar procesamiento) en la interfaz de la pantalla táctil.  
Nota: si tiene problemas para iniciar la estación de preparación, devuelva sus muestras híbridas al bloque de calor; no supere el plazo máximo de 21 horas.
24. Siga las instrucciones de la estación de preparación una vez completado el ciclo.
25. Cuando la estación de preparación haya completado el ciclo, retire con cuidado el cartucho de la estación de preparación y selle los pozos del cartucho con la cubierta adhesiva para pozos de cartuchos suministrada.  
Nota: no deje el cartucho sin sellar en la estación de preparación durante la noche.
26. Si no va a escanear las muestras el mismo día, almacene el cartucho a 4 °C en una caja opaca durante una semana como máximo.

Cómo escanear el cartucho en el analizador digital nCounter

1. Localice el analizador digital vinculado a la estación de preparación que procesó las muestras. Cargue el cartucho en el analizador digital nCounter para escanearlo.
  - a. Abra la compuerta del analizador digital.
  - b. Coloque el cartucho que va a añadir en una ranura vacía.
  - c. Cierre la compuerta y consulte la pantalla táctil.
2. La interfaz de la pantalla táctil del analizador digital tiene distintos gráficos para ayudar a identificar rápidamente el estado de cada posición:
  - a. Ubicación vacía: esta ranura está vacía y lista para ser cargada con un nuevo cartucho.
  - b. Cartucho azul completo: escaneo con éxito.

**NO RETIRE LOS SIGUIENTES CARTUCHOS:**

  - a. Cartucho blanco: esta ranura contiene un cartucho registrado pero no escaneado.
  - b. Cartucho azul parcial: esta ranura contiene un cartucho en proceso de escaneo.
3. Los cartuchos cuyo escaneo haya finalizado pueden retirarse del analizador digital.
4. Si este es el primer cartucho cargado en el analizador digital, toque el botón "Diagnostic" (Diagnóstico) y seleccione "Main Menu" (Menú principal) para iniciar sesión en el analizador digital. Si el analizador digital ya está escaneando cartuchos, pase el paso 9.
5. Coloque con cuidado el cartucho en una ranura libre (consulte la anterior guía sobre estados de cada posición) del analizador digital. La ranura y el cartucho están estirados para contribuir a garantizar la orientación correcta. El código de barras deberá estar orientado hacia arriba.
6. Baje la cubierta de la ranura y presione el cartucho a través de la abertura de la tapa de la ranura para garantizar que el cartucho esté correctamente colocado.
7. Toque el botón "Start Counting" (Iniciar recuento) y espere a que el escáner comience el proceso de escaneo. Oirá una serie de pequeños clics rítmicos cuando el analizador digital comienza a escanear el cartucho.
8. Confirme que aparece una barra azul en la posición del cartucho en la pantalla (en un plazo de cinco minutos) desde el inicio del escaneo) indicando que ha comenzado el escaneo.

9. Para añadir un cartucho a un analizador digital que ya está escaneando cartuchos, toque "Pause" (Pausa) en la pantalla "Counting" (Recuento de cartuchos) y espere a que el analizador digital pause el escaneo actual.
10. Abra la compuerta del analizador digital.
11. Coloque el cartucho que va a añadir en una ranura vacía (consulte la anterior guía sobre estados de cada posición).
12. Cierre la compuerta y toque "Resume" (Reanudar).
13. Cuando se complete el escaneo, el software enviará el informe a las direcciones de correo electrónico de los usuarios previamente especificados.
14. Cuando reciba la notificación por correo electrónico, extraiga el cartucho completado y deséchelo siguiendo las directrices de su institución.  
Nota: se generarán informes sobre los ciclos correctamente completados, así como sobre los ciclos con errores asociados con control de calidad (QC) de datos. No se generarán informes en caso de errores no asociados con QC de datos. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de NanoString para solicitar ayuda en este caso.
15. Utilizando el vínculo que se incluye en ese mensaje de correo electrónico, abra la aplicación web y descargue todos los informes de pruebas asociados con el RSID que se está procesando en ese momento.
16. Seguimiento de errores: siga la recomendación indicada en el informe de la prueba sobre errores concretos del sistema o de muestras.  
Nota: los errores de muestras concretas no se consideran errores del sistema.

12 SOLUCIÓN DE PROBLEMAS Y FALLOS DE PRUEBAS

Tabla 7: Códigos de error para repetición de pruebas

Código de error	Descripción del fallo	Acción recomendada
5	Fallo de escaneo	Vuelva a escanear la muestra con 250 ng de ARN
7	Señal alta	Repita las especificaciones de la muestra y vuelva a realizar la prueba con 125 ng de ARN
6	Señal baja	Repita las especificaciones de la muestra y vuelva a realizar la prueba con 500 ng de ARN
30	Señal baja	Repita las especificaciones de la muestra y vuelva a realizar la prueba con 500 ng de ARN
31	Señal de ARN baja	Repita las especificaciones de la muestra y vuelva a realizar la prueba con 500 ng de ARN

Motivos para repetir la prueba:

1. El informe de la prueba identificará las muestras con errores y no se incluirá ningún resultado de la prueba en el informe. Los resultados de la prueba se incluirán en el informe en el caso de que las muestras aparezcan.
2. El informe de la prueba identificará el tipo de error y la medida recomendada en caso de errores en la prueba. La concentración de ARN de las muestras con errores puede variar a medida que las muestras pueden volver a escanearse (en un nuevo lot/RSID), dependiendo del tipo de error y de la cantidad de masa de ARN restante para obtener un resultado de prueba.

13 RESULTADOS DE LA PRUEBA

La prueba Prosigna incluye una serie de parámetros de control de calidad que se aplican automáticamente a cada muestra durante el análisis. Estos parámetros evalúan el rendimiento de la prueba para determinar si los resultados encajan en los valores esperados. Una vez analizados correctamente estos parámetros de control de calidad, la prueba Prosigna ofrece los siguientes resultados:

Tabla 8: resultados y valores de salida de la prueba Prosigna

Resultado	Valores de salida
El subtipo intrínseco del espécimen de cáncer de mama	Luminal A Luminal B HER2 enriquecido De tipo basal
Cálculo individual de la probabilidad de recurrencia a distancia en un plazo de 10 años	0-100%
Riesgo de recurrencia (ROR)	Valor entero en una escala de 0 a 100
Categoría de riesgo	Bajo, Intermedio, alto

13.1 Subtipos intrínsecos

Se ha demostrado que el subtipo intrínseco de un tumor de cáncer de mama está relacionado con el pronóstico del cáncer de mama en las primeras fases. Como promedio, los pacientes con un tumor luminal A tienen resultados significativamente mejores que los pacientes con tumores luminal B, HER2 enriquecidos o de tipo basal<sup>10</sup>. El subtipo intrínseco se identifica comparando el perfil de expresión génica de 50

Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alfonso Diez  
Gerente  
BIO SYSTEMS S.A.



genes en una muestra desconocida con los perfiles de expresión esperados para los cuatro subtipos intrínsecos. A la muestra desconocida se le asigna el subtipo con el perfil más similar.

Los subtipos de cáncer de mama más comunes son los subtipos luminales, el luminal A (LumA) y el luminal B (LumB). Estudios anteriores sugieren que el luminal A comprende aproximadamente del 30 % al 40 % de los cánceres de mama, y el luminal B, aproximadamente el 20 %<sup>8</sup>. No obstante, más del 90 % de los pacientes con receptores hormonales positivos tienen tumores luminales. El patrón de expresión génica de estos subtipos se asemeja al componente epitelial luminal del tejido mamario<sup>8</sup>. Estos tumores se caracterizan por una alta expresión de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y genes asociados con la activación de ER, como LIV1, GATA3 y ciclina D1, así como por la expresión de citoqueratinas luminales 8 y 18. Los cánceres de mama luminal A muestran una expresión de genes asociados con la activación del ciclo celular menor que los cánceres de mama luminal B, por lo que su pronóstico es mejor.

Estudios anteriores sugieren que el subtipo HER2 enriquecido (HER2-E) comprende aproximadamente el 20 % de los cánceres de mama<sup>8</sup>. No obstante, los tumores HER2 enriquecidos suelen ser de tipo ER negativo, por lo que solo el 5 % de la población de pacientes de tipo ER positivo sometidos a la prueba resultaron tener cáncer de mama HER2 enriquecido. Independientemente de su estado de ER, los tumores HER2 enriquecidos son HER2 positivos en la mayoría de los casos, con alta expresión del cúmulo ERBB2, incluyendo ERBB2 y GRB7. También existe una alta expresión de genes asociados con la activación del ciclo celular.

Los datos publicados sugieren que el subtipo de tipo basal comprende aproximadamente el 20 % de los cánceres de mama<sup>8</sup>. No obstante, los tumores de tipo basal suelen ser de tipo ER negativo, por lo que solo el 1 % de los pacientes con receptores hormonales positivos tienen cáncer de mama de tipo basal. El subtipo de tipo basal casi siempre es clínicamente HER2 negativo y expresa un conjunto de biomarcadores "basales", entre los que se incluyen las citoqueratinas epiteliales basales (CK) y el Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Existe una alta expresión de genes asociados con la activación del ciclo celular.

13.2 ROR

El ROR es un valor entero de una escala del 0 al 100, relacionado con la probabilidad de recurrencia a distancia de un paciente concreto en un plazo de 10 años para la población de uso previsto definida. El ROR se calcula comparando el perfil de expresión de 48 genes en una muestra desconocida con los perfiles esperados para los cuatro subtipos intrínsecos, tal como se describe anteriormente, para calcular cuatro valores de correlación diferentes. Estos valores de correlación se combinan entonces con un índice de proliferación y el tamaño bruto del tumor para calcular el ROR.

13.3 Probabilidad de recurrencia a distancia a 10 años

Los ROR de 2 cohortes de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos en las primeras fases se compararon con la supervivencia sin recurrencia a distancia tras cirugía y tratamiento con 5 años de terapia endocrina adyuvante seguidos de 5 años de observación (consulte más detalles en la sección 16.4, Resultados clínicos). Estos dos estudios dieron como resultado un modelo en el que se relacionaba el ROR con la probabilidad de recurrencia a distancia en esta población de pacientes sometidos a la prueba, incluyendo un intervalo de confianza del 95 %.

13.4 Clasificación del riesgo

También se indica la clasificación del riesgo para permitir la interpretación del ROR mediante valores de referencia relacionados con el resultado clínico en poblaciones de pacientes sometidos a la prueba.

Tabla 9: clasificación del riesgo según intervalo de ROR y estado de los nodos

Estado de los nodos	Intervalo de ROR	Clasificación del riesgo
Nodos negativos	0-40	Bajo
	41-60	Intermedio
	61-100	Alto
Nodos positivos (1-3 nodos)	0-15	Bajo
	16-40	Intermedio
	41-100	Alto
Nodos positivos (≥ 4 nodos)	0-100	Alto

13.5 Control de calidad

Cada lote de componentes de la prueba Prosigna se prueba utilizando especificaciones predeterminadas. Se realiza un seguimiento por lotes de todos los elementos a nivel de kit, y los componentes críticos contenidos en cada kit se prueban de forma conjunta y se presentan como un lote de kits Prosigna.

El kit de la prueba Prosigna incluye una serie de controles internos utilizados para evaluar la calidad de cada serie de ciclos como un todo y de cada muestra individualmente. Estos controles se enumeran a continuación.

Serie de controles de lotes: muestra de referencia de ARN transcrito *in vitro*

Se incluye una muestra de referencia de ARN sintético como control con el fin de la prueba Prosigna de NanoString. La muestra de referencia está compuesta por blancos de ARN transcritos *in vitro* de los 50 genes algorítmicos y los 8 constitutivos. La muestra de referencia se procesa por duplicado en cada ciclo de la prueba Prosigna junto con una serie de hasta 10 muestras desconocidas de ARN de tumor de mama en un tubo de tira de 12 reacciones. La señal de la muestra de referencia se analiza comparándola con umbrales predefinidos para calificar el ciclo.

La señal de cada uno de los 50 genes algorítmicos de la muestra de ARN de tumor de mama se normaliza de acuerdo con los genes correspondientes de la muestra de referencia.

Serie de controles positivos: blancos de ARN transcritos *in vitro* y sondas de captura y marcación correspondientes

Los blancos de ARN sintético se utilizan como controles positivos (PC) para la prueba Prosigna. Las secuencias de blancos de PC tienen su origen en la biblioteca de secuencias de ADN del Consorcio de Control Externo de ARN (ERCC)<sup>9</sup>. Los blancos de ARN se transcriben *in vitro* a partir de plásmidos de ADN. Se incluyen seis blancos de ARN en el kit de la prueba, en una serie de ensayos de titulación cuádruples (concentración final de 128-0,125 fM en la reacción de hibridación), junto con las sondas de captura y marcación correspondientes. Los PC se añaden a cada muestra de ARN de tumor de mama y la muestra de referencia se prueba con la prueba Prosigna. Se descartarán ulteriores análisis de las muestras si las intensidades de la señal de los PC no cumplen los umbrales predefinidos.

Serie de controles negativos: sondas exógenas sin blancos

Las secuencias de blancos de controles negativos tienen su origen en la biblioteca de secuencias de ADN del ERCC<sup>9</sup>. Las pruebas diseñadas para detectar estas secuencias de blancos se incluyen en el kit de la prueba sin la secuencia de blancos correspondiente. Los controles negativos (NC) se añaden a cada muestra de ARN de tumor de mama y la muestra de referencia se prueba con la prueba Prosigna como medida de control de calidad. Se descartarán ulteriores análisis de las muestras si las intensidades de la señal de los NC no cumplen los umbrales predefinidos.

Serie de controles de integridad del ARN: genes constitutivos

En el kit Prosigna se incluyen sondas de captura y marcación diseñadas para detectar 8 genes constitutivos y 50 genes algorítmicos. Los niveles de expresión de los 8 genes constitutivos se analizan para determinar la calidad del ARN extraído de la muestra de tejido FFPE y utilizarla en la prueba Prosigna. Se descartarán ulteriores análisis de las muestras si los niveles de expresión de los genes constitutivos son inferiores a los umbrales predefinidos.

Los genes constitutivos también se utilizan para normalizar cualquier diferencia en la cantidad de ARN intacto en una muestra antes de la normalización de la muestra de referencia.

14 LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

1. La prueba Prosigna se ha optimizado para identificar el subtipo intrínseco de un tumor de cáncer de mama y el riesgo de recurrencia a distancia a 10 años para el paciente como ROR y categoría de riesgo, utilizando ARN purificado extraído de tejido mamario humano fijado en formaldehído y embebido en parafina. Otros tipos de especímenes o fijadores no se han probado, y no deben utilizarse.
2. Los resultados de la prueba Prosigna se validaron únicamente utilizando los procedimientos indicados en este prospecto. Las modificaciones de estos procedimientos pueden alterar los resultados de la prueba.
3. Las características de los resultados de la prueba Prosigna se han establecido para mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos en las primeras fases tratadas con 5 años de terapia endocrina adyuvante. No se han establecido resultados con otros regímenes de tratamiento ni en otras poblaciones de pacientes.
4. Si se añade a la prueba ARN de calidad o cantidad insuficientes, es posible que la prueba Prosigna no pueda ofrecer un resultado válido y, en su lugar, informe sobre un error de la prueba.
5. La interpretación de los resultados de la prueba Prosigna (subtipo intrínseco, ROR y categoría de riesgo) debe evaluarse en el contexto de otros factores clinicopatológicos, la historia clínica del paciente y cualquier otro resultado de pruebas de laboratorio.
6. Los resultados de la prueba Prosigna se han establecido con ARN que cumple las especificaciones definidas en referencia al procedimiento anterior. No se han establecido resultados con ARN aislado que no cumpla estas especificaciones.
7. Entre las sustancias conocidas por interferir con la prueba Prosigna se incluyen el ADN genómico y el tejido no tumoral (p. ej., el tejido normal). Consulte las consideraciones generales sobre la prueba antes de comenzar el procedimiento. Un patólogo debe identificar claramente el área de carcinoma invasivo viable antes de que se ejecuta el procedimiento. Además, cada muestra de ARN debe aislarse con DNase. Antes de continuar con las pruebas de prueba del paciente, cada

88

Dra. SILVINA DANIELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MESA DE PROC. MED.  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Responsable  
BIOSYSTEMS S.A.





nuevo lote de DNasa debe someterse a pruebas y calificarse según la especificación indicada cuando se utiliza un kit de aislamiento distinto al kit de aislamiento de ARN FFPE Roche.

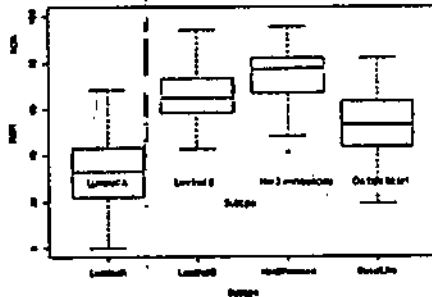
**15 VALORES ESPERADOS**

La prueba Prosigna ofrece un ROR (0-100), un subtipo intrínseco (luminal A, luminal B, HER2 enriquecido o de tipo basal) y una categorización del riesgo (bajo, intermedio o alto) para cada muestra de tumor. De acuerdo con los dos estudios de validación clínica descritos a continuación, mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama HR+ en las primeras fases tratadas con anastrozol o tamoxifeno en los ensayos ATAC y ABCSG-8, se indican el intervalo y la frecuencia de ROR (Figura 10), la relación continua del ROR con la probabilidad de recurrencia a distancia según el estado de los nodos (Figura 11) y la distribución de ROR según subtipo intrínseco (Figura 8) esperados. De acuerdo con estos estudios de validación clínica, la supervivencia sin recurrencia a distancia durante 10 años según la categorización del riesgo se representa en la Figura 12 (pacientes con nodos negativos) y la Figura 13 (pacientes con nodos positivos (nodos 1-3)).

**15.1 Intervalo de ROR por subtipo**

La Figura 9 muestra un diagrama de caja de ROR por subtipo intrínseco.

Figura 9: diagrama de caja de ROR por subtipo intrínseco



**15.2 Frecuencia de ROR según estado de los nodos**

El histograma de la Figura 10 se generó utilizando un modelo de Cox simple que incluía variables categóricas y ROR para distinguir los tres grupos de implicación nodal.

Figura 10: histograma de ROR y grupos de estado de los nodos

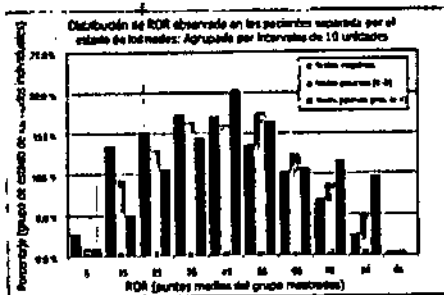
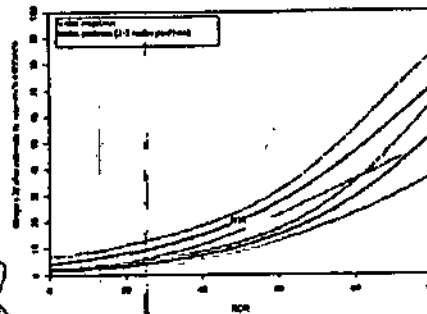


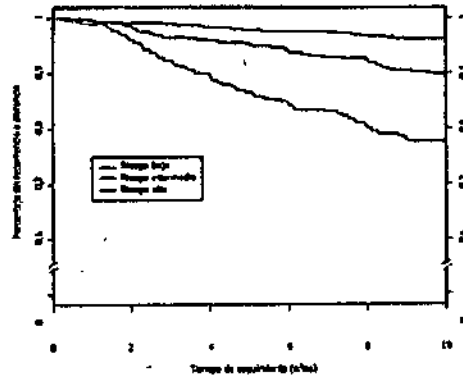
Figura 11: riesgo estimado a diez años por grupo de estado de los nodos



**15.3 Supervivencia sin recurrencia a distancia según categorización del riesgo**

Los siguientes datos se obtienen del análisis combinado de los ensayos TransATAC y ABCSG-8. Para asignar pacientes a distintos grupos de riesgo, se compararon los ROR con los umbrales de riesgo predefinidos para pacientes con nodos negativos y nodos positivos. Las Figuras 12 y 13 muestran la supervivencia sin recurrencia a distancia a 10 años para cada grupo de categoría de riesgo según el estado de los nodos.

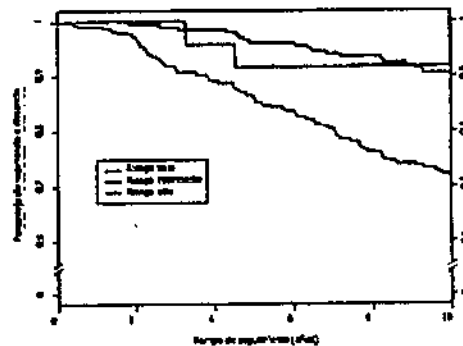
Figura 12: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos



Resumen de datos de la Figura 12: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95% de CI]
Bajo	875 (49%)	31	98,2% [94,7%-97,5%]
Intermedio	551 (31%)	53	89,2% [88,1%-91,7%]
Alto	360 (20%)	73	77,7% [72,8%-81,9%]
Total	1.786 (100%)	157	

Figura 13: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)



Resumen de datos de la Figura 13: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95% de CI]
Bajo	24 (4%)	2	91,7% [70,6%-97,8%]
Intermedio	211 (36%)	18	90,4% [85,2%-93,9%]
Alto	355 (60%)	87	71,8% [66,3%-78,6%]
Total	590 (100%)	107	

Tabla 10: índices de DRFS a diez años para pacientes con 4 o más nodos positivos

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95% de CI]
Alto	100	39	57,4% [48,3%-67,0%]

Handwritten initials 'B'

Dra. SILVANA MANUELA DIRECTORA TÉCNICA  
TEL: 442  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez Gerardo  
BIOSYSTEMS S.A.



6293

16 CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS

16.1 Precisión y reproducibilidad de los análisis

Para calcular la precisión y reproducibilidad generales de Prosigna, se realizaron dos estudios y se combinaron los resultados. El primer estudio realizado fue un estudio de la precisión del sistema de análisis nCounter Dx a partir de ARN de un tumor de mama extraído, y el segundo estudio fue un estudio de reproducibilidad a partir de tejido de tumor de mama FFPE que incluía factores anteriores al análisis.

Precisión del ARN

16.1.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio comparativo aleatorio y ciego en tres centros con la prueba Prosigna en el sistema de análisis nCounter Dx para evaluar la precisión de los análisis. Se generaron cinco muestras conjuntas de ARN de tumor de mama a partir de especímenes FFPE archivados para realizar pruebas en cada centro. El panel de muestras representaba perfiles de expresión génica prototípicos hallados durante pruebas rutinarias y cada grupo de clasificación de riesgo.

En cada centro se completaron 18 ciclos válidos (6 ciclos por operador, cada ciclo compuesto por 10 pruebas) tras un ciclo de familiarización de cada operador (Tabla 11). Cada muestra se probó por duplicado durante cada ciclo con un nivel de ARN nominal utilizado en la prueba de 250 ng. Cada operador completó un ciclo en un día dado aplicando la norma generalmente aceptada para métodos a largo plazo. El periodo total de estudio, incluida la familiarización, cubría más de 4 semanas en cada centro.

Tabla 11: descripción general del estudio de precisión del ARN

Variable del estudio	Números
N.º de muestras de ARN de tumor de mama	5
N.º de duplicados de muestras por ciclo (mismo cortejo)	2
N.º de ciclos/centro	18
N.º de ciclos/día	1
N.º de operadores/centro	2
N.º de lotes de reactivos/centro	3
N.º de centros	3
N.º total de muestras probadas por centro (excluyendo la familiarización)	180
N.º total de muestras	540

16.1.2 Análisis de componentes de varianza

La Tabla 12 muestra los resultados del análisis de componentes de varianza de cada miembro del panel. A continuación la varianza estimada es el porcentaje de varianza total (entre paréntesis).

Tabla 12: componentes de varianza según el miembro del panel (muestra de ARN conjunta)

Miembro del panel según riesgo y subtipo	ROR medio	Componente de varianza					Varianza total	SD total
		Lote	Centro	Operador	Ciclo	Intraciclo		
Luminal A bajo	31,4	0,010 (2%)	0,003 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (29%)	0,295 (67%)	0,44 (1,00%)	0,66
Luminal B intermedio	55	0,105 (19%)	0,005 (0%)	0,000 (0%)	0,048 (9%)	0,425 (74%)	0,576 (1,00%)	0,76
De tipo luminal intermedio	55,4	0,058 (23%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,048 (17%)	0,184 (65%)	0,299 (1,00%)	0,55
Luminal B alto	64,0	0,118 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,385 (66%)	0,578 (1,00%)	0,78
HER2 amplificado alto	78,2	0,185 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (67%)	0,442 (1,00%)	0,80

En los cinco miembros del panel, el SD total fue inferior a 1 unidad ROR en una escala de 0 a 100. En todos los miembros del panel, la mayor parte de la varianza procedía de la varianza intraciclo (repetibilidad). Apenas existía varianza entre centros ni entre operadores. Una prueba de ratio de probabilidad para evaluar la importancia de los centros en función del miembro del panel demostró que las diferencias entre centros eran estadísticamente insignificantes ( $p > 0,05$ ). En cada lote, el ROR medio es inferior a 1 unidad ROR. Además, cada miembro del panel contribuye con aproximadamente un 20 % de media a la varianza total.

16.1.3 Concordancia de la invocación de subtipo y la clasificación del riesgo

En todos los miembros del panel, hubo una concordancia del 100 % entre el resultado del subtipo y el subtipo intrínseco del miembro del panel. En todas las muestras, hubo una concordancia del 100 % entre el grupo de riesgo medido y esperado.

Capacidad de reproducción del tejido

16.1.4 Diseño del estudio

Se realizó un estudio comparativo aleatorio y ciego en tres centros utilizando especímenes de tejido de tumor de mama duplicados, extraídos del mismo bloque FFPE, en el sistema de análisis nCounter Dx con la prueba Prosigna. Como parte del estudio, se realizaron pruebas en una serie de 43 especímenes de tumor de mama FFPE recientemente obtenidos de pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos y carcinoma lobulillar o ductal invasivo confirmado. Todos los especímenes de tejido se enviaron al correspondiente centro de pruebas para su procesamiento. Tres patólogos revisaron de forma independiente los 43 especímenes. Un único operador realizó para cada muestra de tejido revisado por los patólogos un ciclo de prueba compuesto por la macrodissección del tejido, la extracción de ARN y las pruebas con la prueba Prosigna en cada centro utilizando el procedimiento de prueba definido. El ARN aislado de cada muestra de tejido se probó dos veces en ciclos de prueba distintos. Se utilizaron tres lotes del kit de aislamiento de ARN (uno por centro) y un único lote de reactivos del kit de prueba en la ejecución de este estudio. Se utilizó un único portaobjetos para la extracción de ARN cuando el área de superficie tumoral medida  $\geq 100 \text{ mm}^2$ , y se utilizaron 3 portaobjetos cuando la superficie tumoral medida  $< 100 \text{ mm}^2$ , con una área de superficie tumoral mínima necesaria de  $4 \text{ mm}^2$ .

16.1.5 Resumen de las pruebas

El índice de invocación de los cuarenta y tres (43) especímenes de tejido evaluados en cada uno de los tres centros se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Índice de invocación en cada centro

Centro	Porcentaje que ofrece resultados	Aprobado/Total
1	95%	41/43
2	100%	43/43
3	100%	43/43

Cuarenta especímenes ofrecieron resultados en todos los centros (fue necesario repetir el aislamiento de ARN de una muestra en un centro). 1 espécimen ofreció resultados en 2 centros y 2 especímenes ofrecieron resultados en un único centro. El 100 % de la muestra que superaron las especificaciones de aislamiento de ARN y de revisión del tejido ofrecieron resultados válidos en la prueba Prosigna. El área de superficie tumoral medida para 4/5 lotes de aislamiento de ARN fue  $\leq 15 \text{ mm}^2$ , que equivale a menos de  $50 \text{ mm}^2$  de tejido total por área utilizada en la prueba.

Los 43 especímenes incluyeron pacientes con nodos negativos y con nodos positivos. Los resultados de las pruebas calculados a partir de los 43 especímenes representan una amplia variedad (84 unidades) de ROR, los 4 subtipos intrínsecos y todas las categorías de riesgo al aplicar valores de referencia de nodos negativos o nodos positivos a todos los especímenes. Las dos muestras con resultados en un único centro se excluyeron de todos los análisis estadísticos posteriores, ya que no existían datos disponibles para comparar los centros.

16.1.6 Análisis de componentes de varianza

No se detectaron diferencias estadísticamente importantes ( $\alpha = 0,05$ ) entre categorías de riesgo utilizando una prueba Kruskal-Wallis no paramétrica, de modo que el modelo de componentes de varianza se utilizó simultáneamente en todas las categorías de riesgo.

La Tabla 14 muestra los resultados del análisis de los componentes de varianza utilizando los 41 especímenes de tejido.

Tabla 14: componentes de varianza (estudio de la capacidad de reproducción del tejido)

Centro	Componentes de varianza			SD total
	Intrabloque	Residual	Total	
0,10	7,72	0,51	8,34	0,89

El componente de centro mide la variación sistemática específica del centro, el componente "Intrabloque" mide la variación aleatoria que difiere como función de la revisión/procesamiento de especímenes de tejido o variación intrabloque FFPE y la variación residual mide la variabilidad combinada entre ciclos y la variabilidad intraciclo de la prueba Prosigna. El componente de centro es muy pequeño en relación con la variabilidad aleatoria intrabloque, lo que indica que las diferencias entre los centros, como promedio, fueron insignificantes ( $< 1 \%$  de varianza total). La variación residual fue coherente con la variabilidad equivalente medida en el estudio de precisión de ARN, que contribuye con menos muestras, pero con más mediciones duplicadas (varianza del 0,51 en comparación con un centro único medio dentro de la varianza del lote de reactivos Prosigna de 0,39 para el estudio de precisión del ARN).

62913



La Tabla 15 resume la variabilidad total utilizando la suma de la variabilidad del procesamiento de tejidos (componentes de centro e intrabloque de la Tabla 14 de este estudio), así como la variabilidad de procesamiento del ARN total del estudio de precisión del ARN (promedio obtenido de los cinco miembros del panel probados en la Tabla 12). Los factores preanalíticos asociados al procesamiento de tejidos son la fuente principal de variación de la prueba (94 % de la varianza total). El SD total, incluidas todas las fuentes de variación, equivale a 2,9, lo que indica que la prueba Prosigna es una medida fiable de la diferencia entre dos valores de ROR de 6,75 con una confianza del 95 %

Tabla 15: variabilidad total (procesamiento de tejidos y ARN)

Variabilidad del procesamiento de tejidos	Variabilidad del procesamiento de ARN	Variabilidad total	SD total
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Concordancia de las clasificaciones de subtipos y categorías de riesgo

La concordancia entre centros según el subtipo de paciente y la clasificación del riesgo (riesgo bajo/intermedio/alto) se muestra en la Tabla 16, donde se aplicaron los correspondientes valores de referencia del riesgo de las clasificaciones de nodos negativos y nodos positivos a todos los especímenes. Los intervalos de confianza del 95 % de tipo exacto se muestran entre corchetes, y el número de muestras con resultados en ambos centros se muestra entre paréntesis. La concordancia media se muestra en la última columna. En cada comparación, la concordancia se calculó en dos pasos. En primer lugar, para cada muestra de tejido, se calculó la proporción de los cuatro pares de resultados posibles (dos en el centro 1 + dos en el centro 2) correspondientes. En el segundo paso, se calculó el promedio de estas proporciones para todas las muestras de tejido que generaron resultados en ambos centros en dicha comparación.

Tabla 16: resumen de la concordancia de subtipo y categoría de riesgo en función del estado de los nodos

Tipo de comparación	Concordancia entre pares			Concordancia media
	Centro 1 frente a centro 2 (n = 40)	Centro 1 frente a centro 3 (n = 41)	Centro 2 frente a centro 3 (n = 40)	
Subtipo	98,3% (95,4 % - 99,6 %)	98,8% (91,0 % - 100 %)	93 % (83,1 % - 99,3 %)	97%
Categoría de riesgo	87,5% (78,2 % - 95,8 %)	92,7% (80,1 % - 99,4 %)	90% (76,4 % - 99,2 %)	90%
Nodos negativos				
Categoría de riesgo	98,8% (75,9 % - 98,0 %)	92,7% (80,1 % - 98,1 %)	81,3% (76,2 % - 97,4 %)	91%
Nodos positivos				

En cada comparación (subtipo y categorías de riesgo de nodos negativos y positivos), la concordancia media entre centros fue al menos del 90 %. No hubo muestras en las que la categoría del riesgo cambiara de bajo riesgo a alto riesgo (o viceversa) entre centros o dentro de un mismo centro. Hubo únicamente dos especímenes (de 41) cuyos subtipos no fueron idénticos en los 6 duplicados:

1. Un espécimen arrojó resultados duplicados de luminal A en un centro y resultados duplicados de luminal B en cada uno de los otros dos centros.
2. Un espécimen arrojó resultados duplicados de luminal A en un centro, resultados duplicados de HER2 enriquecido en otro centro y uno de luminal A y otro de HER2 enriquecido en el tercer centro.

16.2 Sensibilidad/ARN utilizado

Descripción del estudio de ARN utilizado

El estudio probó 13 muestras de ARN de tumor de mama en tres niveles de ARN utilizados dentro de la especificación de la prueba (500, 250 y 125 ng) y dos niveles de ARN adicionales utilizados fuera de la especificación (625, 62,5 ng). Cada muestra se probó con cada lote del kit (2 lotes en total) en un único ciclo de prueba que incluyó medidas duplicadas en cada nivel de la especificación y una única medida por cada nivel fuera de la especificación. Se incluyeron medidas en blanco duplicadas (es decir, que no son blancos) en cada ciclo de prueba. Solo se probó una única muestra con un único lote.

Resultados del estudio de ARN utilizado

Todas las muestras en blanco medidas (n = 46) estuvieron muy por debajo del umbral de señal y ofrecieron un resultado de prueba erróneo (índice de invocación del 0 %). Todas las mediciones de ARN de tumor que cumplían con las especificaciones de la prueba (n = 138) ofrecieron un resultado de prueba aprobado (índice de invocación del 100 %). El 100 % de los especímenes con una cantidad superior a la especificación (625 ng) ofrecieron un resultado de prueba aprobado. El 83 % de los especímenes (10/12) probados con una cantidad inferior a la especificación (62,5 ng) ofrecieron un resultado de prueba en el lote 1 con un 100 % en el lote 2.

El ROR medio de las 13 muestras cubrió un amplio intervalo (20-82). El 100 % del grupo de riesgo (bajo/intermedio/alto) coincidió al 100 % en todos los niveles de ARN utilizados para las 13 muestras en las que se realizaron pruebas. La Tabla 17 resume la variación de ROR como una función del ARN utilizado. Se utilizaron la diferencia de ROR medio entre niveles de ARN utilizado, el SD correspondiente a las diferencias y el intervalo de confianza del 90 % para evaluar si los ROR generados a partir de distintos niveles de ARN utilizado eran equivalentes a los generados utilizando el nivel blanco de 250 ng. Para cumplir el criterio de aceptación, el intervalo de confianza debía incluirse por completo en (-3,3 ROR). En los dos niveles de los extremos del intervalo de la especificación de la prueba (125 y 500 ng de ARN), los ROR eran equivalentes a los de la concentración blanco utilizada de 250 ng para cada uno de los dos lotes del kit probados. En cada nivel fuera de la especificación de la prueba, los ROR eran equivalentes a uno de los lotes, pero no al otro.

Tabla 17: resumen de las diferencias de ROR. El recuento equivale al número de muestras incluidas en el análisis.

Lote del kit	Masa (ng)	Recuento	Diferencia de ROR medio	SD de diferencia	Límite mínimo de confianza	Límite máximo de confianza
20535	62,5-250	10	1,90	2,82	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
	825-250	12	-0,13	0,86	-0,53	0,28
20536	62,5-250	11	-0,36	3,96	-2,33	1,60
	125-250	11	-0,50	3,07	-2,02	1,02
	500-250	11	-0,82	3,25	-2,43	0,79
	825-250	11	-1,06	4,24	-3,19	1,01

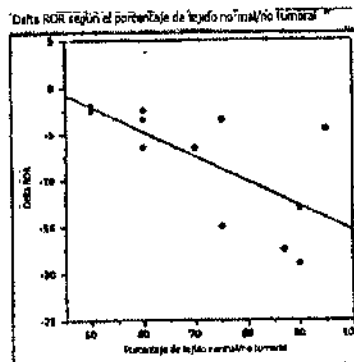
16.3 Pruebas de interferencia

Tejido no tumoral/normal adyacente

El tejido de mama no tumoral/normal adyacente suele estar presente en bloques de tumor de mama FFPE y puede identificarse durante la revisión patológica como un área distinta del área del carcinoma de mama invasivo. El anterior procedimiento de prueba Prosigna específica la extracción de tejido normal adyacente mediante macrodissección. Para evaluar el riesgo de contaminación por tejido normal de los resultados de la prueba, se probaron un total de 13 bloques de tumor de mama FFPE con carcinoma ductal infiltrante confirmado patológicamente y aproximadamente un 50-95 % de tejido no tumoral/normal circundante con y sin macrodissección del tejido circundante, y se determinó la diferencia en el ROR (delta ROR).

Como promedio, el ROR de la muestra tumoral macrodisseccionada fue de casi 8 unidades de ROR por encima de lo observado cuando el tejido no tumoral/normal no se extraía. La Figura 14 ilustra que a medida que aumenta la cantidad de tejido normal (hasta un 95 % no extraído mediante macrodissección), existe un riesgo cada vez mayor de que el ROR obtenido sea un cálculo infravalorado o sesgado negativamente (hasta -18 unidades de ROR) del riesgo de recurrencia de un paciente.

Figura 14: Impacto del tejido no tumoral/normal en Delta ROR.



Interferencia de tejido DCIS, hemorrágico y necrótico

Para evaluar el riesgo de contaminación DCIS/hemorrágica/necrótica de los resultados de la prueba, se probaron un total de 11 bloques de tumor de mama FFPE (3 DCIS, 5 necróticos, 3 hemorrágicos) con carcinoma de mama invasivo confirmado patológicamente y aproximadamente un 10-30% de los interferentes con y sin macrodissección de los interferentes, y se determinó la diferencia en el ROR (delta ROR). En los niveles probados, el efecto del tejido necrótico, DCIS y sanguíneo/hemorrágico incluido en el procedimiento tuvo un impacto insignificante en el ROR obtenido (< 6 unidades de ROR). Se obtuvo una concordancia del 100 % en la asignación de categorías de riesgo entre las once muestras DCIS, hemorrágicas y necróticas con y sin macrodissección.

6293



**ADN genómico humano**

El procedimiento de la prueba Prosigna incluye la eliminación de ADN genómico humano (gADN) mediante digestión con DNasa I. Para evaluar el riesgo de contaminación por gADN de los resultados de la prueba, se realizaron pruebas en diez (10) bloques de tumor de mama FFPE con carcinoma ductal infiltrante confirmado patológicamente, +/- extracción de ADN genómico humano, omitiendo el paso de DNasa en el procedimiento. Como promedio, en las muestras probadas, el ROR fue entre 4 y 5 unidades menor en los grupos de riesgo bajo e intermedio cuando se extrajo el gADN con DNasa I (consulte la Tabla 18). Cuando las muestras no tratadas en lo referente a la DNasa I se trataron posteriormente con DNasa (posttratamiento), el ROR coincidió con los valores de ROR observados originalmente con el tratamiento de DNasa I establecido en el protocolo. Existe el riesgo de que el ROR obtenido sea un cálculo sobrevalorado o sesgado positivamente (hasta 7 unidades de ROR) del riesgo de recurrencia de un paciente en presencia de gADN. Además, la señal calculada para muestras sin tratamiento de DNasa I fue considerablemente inferior ( $p < 0,05$ ) que las tratadas con DNasa I, debido a la interferencia en la lectura de la absorbancia utilizada para cuantificar la cantidad de ARN antes de la prueba con la prueba Prosigna.

Tabla 18: Impacto del tratamiento con DNasa en el ROR de muestras tumorales

ROR Categoría	Especímenes FFPE probados	Diferencia de ROR con DNasa I - sin DNasa I			Diferencia de ROR con DNasa I - con DNasa I (después del tratamiento)		
		Promedio	Mín.	Máx.	Promedio	Mín.	Máx.
Bajo	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Intermedio	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Alto	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

**16.4 Resultados clínicos**

Se llevaron a cabo dos estudios de validación clínica para validar la prueba Prosigna de firma genética para el pronóstico del cáncer de mama. El objetivo principal de ambos estudios era validar las observaciones publicadas de que el riesgo de recurrencia (ROR) ofrece información de pronóstico adicional sobre la supervivencia sin recurrencia a distancia a 10 años, más allá y por encima de las variables clínicas estándar. Además, un objetivo secundario de ambos estudios era validar observaciones anteriores de que pacientes con cáncer de mama luminal A y luminal B tienen una supervivencia sin recurrencia a distancia a 10 años muy diferente estadísticamente. Dado que los resultados y los criterios de entrada de estos dos estudios eran similares, las dos bases de datos se combinaron y analizaron con un plan de análisis definido prospectivamente que contaba con los mismos objetivos que los estudios individuales.

**Análisis combinado: generación de curvas de riesgo mediante el uso de resultados combinados de la prueba Prosigna a partir de TransATAC y ABCSG-8**

A continuación se expone un resumen de las características clínicas y de tratamiento del análisis combinado. Si desea obtener información sobre el análisis y el diseño de cada estudio, consulte las siguientes secciones para obtener información sobre los estudios 1 y 2, respectivamente.

*[Handwritten signature]*

**Análisis**

Tabla 19: resumen de las características clínicas y de tratamiento en el análisis combinado de los estudios 1 y 2

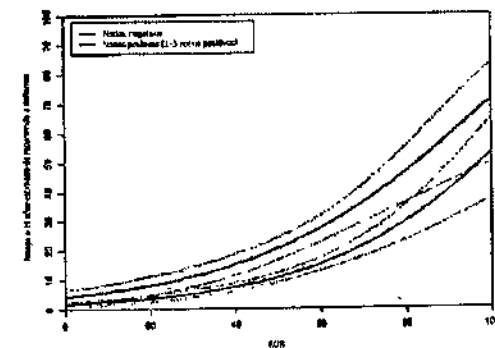
Característica	Valor	Nodos negativos (n = 1786)		1-3 nodos positivos (n = 590)		> 4 nodos positivos (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1.047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Tratamiento	Albóndola/anastrozol	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Bolo tamoxifeno	362 (49,0%)	619 (59,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
Grado	G1	169 (22,9%)	210 (20,1%)	39 (18,8%)	54 (14,1%)	3 (5,6%)	7 (14,3%)
	G2/GX	498 (67,3%)	837 (79,9%)	122 (58,7%)	328 (85,9%)	37 (68,5%)	42 (85,7%)
	G3	132 (17,8%)	0 (0%)	47 (22,8%)	0 (0%)	4 (7,4%)	0 (0%)
Tamaño del tumor	≤ 1 cm	122 (16,6%)	113 (10,9%)	13 (6,2%)	37 (9,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)
	1-2 cm	420 (56,8%)	568 (54,3%)	83 (39,0%)	180 (46,9%)	15 (27,8%)	18 (36,7%)
	2-3 cm	157 (21,2%)	213 (20,3%)	77 (37,0%)	122 (31,9%)	16 (29,6%)	23 (46,9%)
	> 3 cm	40 (5,4%)	47 (4,5%)	35 (16,8%)	30 (7,8%)	18 (33,3%)	6 (12,2%)
Estado de HER2	Negativo	849 (115,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	307 (80,1%)	47 (87,0%)	40 (81,6%)
	Positivo	90 (12,2%)	63 (6,1%)	22 (10,6%)	16 (4,1%)	7 (12,9%)	9 (18,4%)
Recurrencias	A distancia	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Coductos	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	79 (20,5%)	34 (62,0%)	10 (20,4%)
Subtipo intrínseco de NanoString	Luminal A	529 (71,9%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Luminal B	176 (23,8%)	284 (27,1%)	86 (40,9%)	118 (30,9%)	23 (42,6%)	16 (32,7%)
	Del tipo basal	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2 anqueado	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Ambos estudios incluían un método de tratamiento consistente en 5 años de tamoxifeno. En TransATAC, el otro método de estudio consistía en 5 años de anastrozol, mientras que en el estudio ABCSG-8, el segundo método consistía en 2 años de tamoxifeno seguidos de 3 años de anastrozol. Cuando se modeló la DR como función de todas las variables clínicas y de tratamiento, el tratamiento no contribuyó de forma significativa ( $p = 0,86$ ) como pronóstico de la DR. Las otras diferencias principales entre estos ensayos fueron el hecho de que el ensayo TransATAC incluyó pacientes con tumores de grado 3, y que el índice de recurrencia general era superior en el estudio TransATAC que en el estudio ABCSG-8.

**Resultados**

La Figura 15 muestra el riesgo de DR a 10 años como función del ROR con bandas de confianza del 95 % según distintos modelos de riesgos proporcionales de Cox para cada grupo de pacientes con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos positivos).

Figura 15: riesgo de DR estimado a diez años según el estado de los nodos con intervalos de confianza del 95 %



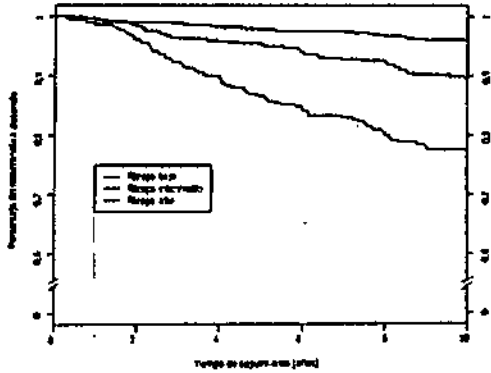
La Figura 16 muestra los estimadores Kaplan-Meier de incidencias según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos, y la Figura 17 muestra los mismos estimadores para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos. En cada figura, se muestran detalles de los tamaños de las muestras, números de episodios y porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años según el grupo de riesgo. En el grupo de pacientes con nodos positivos, había muy pocos pacientes en los

6293



grupos predefinidos de bajo riesgo, lo que se tradujo en que el intervalo de confianza de la curva Kaplan-Meier y, por tanto, el cálculo de DRFS a 10 años, fueron muy amplios.

Figura 16A: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos



Resumen de datos de la Figura 16A: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	875 (49 %)	11	89,2 % (84,7 % - 97,3 %)
Intermedio	551 (31 %)	53	89,2 % (86,1 % - 91,7 %)
Alto	360 (20 %)	73	71,7 % (72,8 % - 81,8 %)
Total	1.786 (100 %)	137	

Figura 16B: Incidencia por grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos en intervalos de cinco años

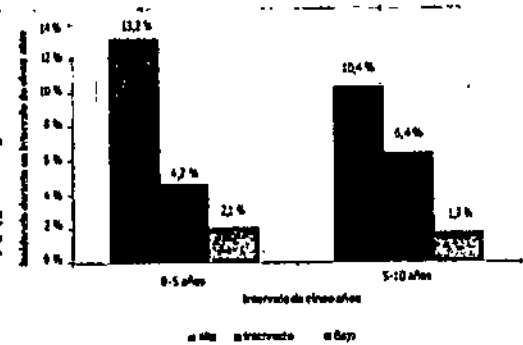
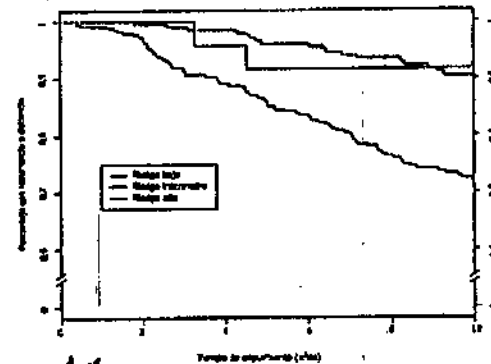


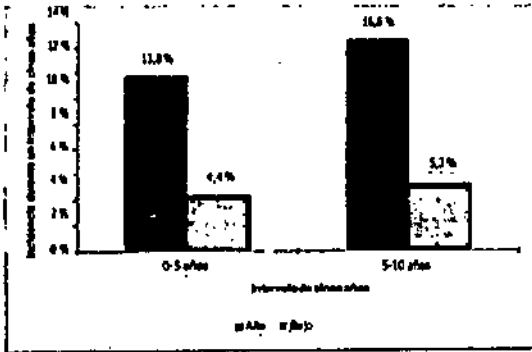
Figura 17A: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos



Resumen de datos de la Figura 17A: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	24 (4 %)	2	81,7 % (70,6 % - 97,8 %)
Intermedio	211 (36 %)	18	90,4 % (85,2 % - 93,9 %)
Alto	355 (60 %)	87	71,8 % (66,3 % - 76,6 %)
Total	590 (100 %)	107	

Figura 17B: Incidencia por grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) en intervalos de cinco años



En la Figura 17B, dado que tan solo había 24 pacientes con 2 episodios en el grupo de nodos positivos de bajo riesgo, estos pacientes se han combinado con los pacientes intermedios para análisis de recurrencia tardía.

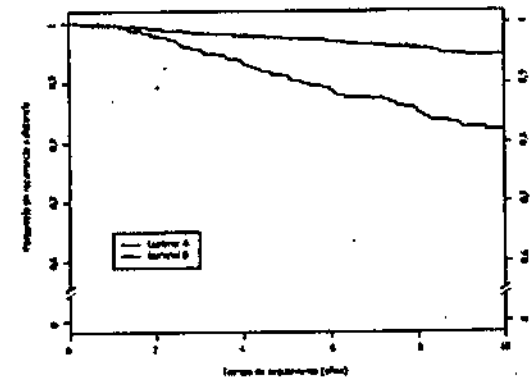
Los 103 pacientes de la base de datos combinada con 4 o más nodos positivos están clasificados como de alto riesgo. La Tabla 20 muestra los índices de DRFS a diez años para estos pacientes.

Tabla 20: índices de DRFS a diez años para pacientes con 4 o más nodos positivos

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Alto	103	39	57,4 % (46,3 % - 67,0 %)

La mayoría de los sujetos de los estudios combinados (96 %) eran pacientes con cáncer luminal A o luminal B. La Figura 18 muestra una comparación de la DRFS según el subtipo luminal para pacientes con nodos negativos

Figura 18: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos negativos



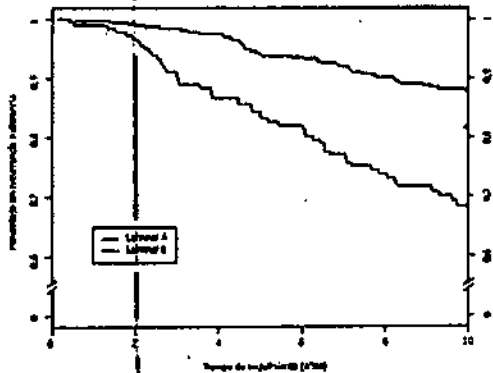
6293

Resumen de datos de la Figura 18: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Luminal A	1254	62	94.6 [93.1-95.8]
Luminal B	488	73	81.9 [77.7-85.3]
Total	1744	137	

La Figura 19 muestra la misma comparación para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos. En ambos grupos, hubo diferencias importantes entre la DRFS de los pacientes con cáncer luminal A y luminal B.

Figura 19: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos



Resumen de datos de la Figura 19: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Luminal A	375	41	87.8 [83.5-90.8]
Luminal B	126	52	68.3 [60.4-75.8]
Total	501	93	

Solo había 98 pacientes de subtipo luminal en la base de datos combinada con 4 o más nodos positivos. La Tabla 21 muestra los índices de DRFS a diez años para estos pacientes, que también muestran un riesgo mucho más alto cuando tienen un subtipo luminal B.

Tabla 21: índices de DRFS a diez años para pacientes con 4 o más nodos positivos según el subtipo luminal

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Luminal A	62	17	68.3 [53.6-79.3]
Luminal B	38	20	38.0 [21.4-54.5]
Total	100	37	

**Análisis de recurrencia tardía**

En los datos de análisis combinados descritos anteriormente, los índices de episodios de cada grupo de riesgo no son constantes en el intervalo de 10 años, tal y como puede observarse en las Figuras 16B y 17B. Para conocer mejor la DR en el periodo de recurrencia tardía, se realizó un análisis retrospectivo post-hoc de los datos combinados descritos anteriormente para el subconjunto de pacientes que estuvieron libres de recurrencia a distancia durante cinco años (un total de 2163 pacientes\*). De estos, 1605 eran pacientes con nodos negativos y 488 eran pacientes con nodos positivos (1-3 nodos positivos). En cada grupo de nodos, los valores que aparecen debajo del eje x en el año número 5 en las figuras 20 y 21 muestran el número de pacientes por grupo de riesgo a los cinco años, es decir, los pacientes aptos para el análisis de recurrencia tardía.

La Tabla 22 muestra un resumen de las características clínicas y de tratamiento de los pacientes con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos) en el análisis de recurrencia tardía.

Tabla 22: resumen de las características clínicas y de tratamiento del análisis de recurrencia tardía

Característica	Valor	Nodos negativos (n = 1605)		Nodos positivos (1-3 nodos) (n = 488)	
		ABCSG (n = 944)	ranATAC (n = 661)	ABCSG (n = 311)	ranATAC (n = 177)
Tratamiento	Algo de endocrinal	480	348	153	89
	Solo tamoxifeno	464	313	158	88
Grado	Buena	192	158	48	30
	Modificado	752	294	265	106
	Mala	0	109	0	38
Tamaño del tumor	≤ 1 cm	204	118	35	11
	1-2 cm	628	378	185	74
	2-3 cm	163	138	60	64
	> 3 cm	31	30	11	28
Estado de HER2	Negativo	638	590	300	157
	Positivo	56	21	11	20
Recurrencias	A distancia	41	40	19	28
	Cualquiera	71	78	37	37
Subtipo intrínseco de HER2/EG	Luminal A	674	488	218	113
	Luminal B	345	150	87	54
	De tipo basal	4	5	0	1
	HER2 amplificado	21	14	6	18

El objetivo principal era evaluar la capacidad de ROR de proporcionar información de pronóstico adicional importante de DRFS más allá y por encima de las variables clínicas estándar entre los años 5 y 10. Un modelo nulo consistente únicamente en CTS se comparó con un modelo alternativo consistente en CTS y ROR utilizando una prueba de ratio de probabilidad (LR). El ROR añadió información estadísticamente importante para DRFS una vez transcurridos los 5 años más allá y por encima de las variables clínicas estándar de todos los pacientes ( $p < 0.0001$ ), así como de los pacientes con nodos negativos ( $p < 0.0001$ ) y nodos positivos (1-3 nodos) ( $p < 0.0001$ ).

La Tabla 23 muestra un resumen de las ratios de riesgos para un cambio de 10 puntos basado en un análisis univariante y en un análisis multivariante que incluyen tanto ROR como CTS. Las ratios de riesgos de ROR son significativamente diferentes a 1 incluso después del ajuste de CTS. Los índices C también aparecen en la Tabla 22. En ambos grupos, el índice C fue muy diferente al valor sin información de 0.5.

Tabla 23: resumen de las pruebas de recurrencia tardía


Número de nodos positivos	N	Ratio de riesgos: cambio en ROR de 10 puntos		Índice C con un 95 % de intervalos de confianza		
		Análisis univariante	Análisis multivariante	Índice C	Inferior	Superior
0	1605	1.38 [1.23-1.54]	1.28 [1.15-1.43]	78%	64.6%	75.2%
1-3	488	1.43 [1.25-1.63]	1.38 [1.18-1.61]	71%	64.0%	78.2%

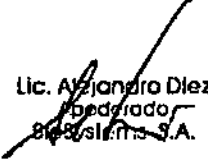
La mayoría de los pacientes de los dos estudios tenían nodos HER2 negativos. La Tabla 24 muestra la distribución del estado de HER2 de las mujeres con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos). En ambos grupos, más del 80 % de las mujeres de los estudios tenían nodos HER2 negativos.

Tabla 24: distribución del estado de HER2 según el número de nodos positivos

Subconjunto de pacientes	Estado de HER2		Total
	Negativo	Positivo	
Pacientes con nodos negativos	1478 (92.1%)	127 (7.9%)	1605
Pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos	457 (93.6%)	31 (6.4%)	488

La Tabla 25 muestra una comparación del modelo multivariante adoptado para todos los pacientes de un determinado grupo de nodos y el modelo ajustado para todos los pacientes con nodos HER2 negativos del grupo. No existen diferencias estadísticamente importantes.


  
 Dra. SILVANA... LA
   
 DIRECTORA... CA
   
 BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez
   
 Medico
   
 BIOSYSTEMS S.A.
   


6293

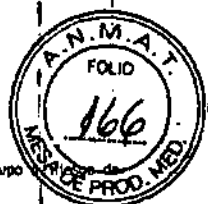


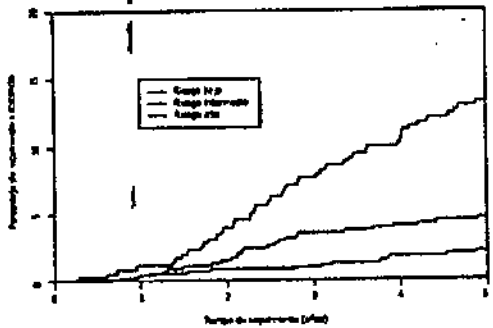
Tabla 25: ratios de riesgos multivariantes para cambio de ROR de 10 puntos: todos los pacientes del subgrupo frente a los pacientes con nodos HER2 negativos del subgrupo

Número de nodos positivos	Todos los pacientes (95 % de CI)	Pacientes con nodos HER2 negativos (95 % de CI)
Pacientes con nodos negativos	1,29 (1,15-1,49)	1,38 (1,19-1,54)
Pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos	1,34 (1,19-1,53)	1,29 (1,11-1,50)

La comparación entre los grupos de riesgo se examina con mayor profundidad en las Figuras 20 y 21, que muestran las curvas de incidencias de la recurrencia a distancia temprana y tardía por grupo de riesgo en los pacientes con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos), respectivamente. Las curvas de incidencias abarcan el periodo de recurrencia temprana (en los primeros 5 años) y el periodo de recurrencia tardía (entre los años 5 y 10 después del diagnóstico). Cada figura muestra el número de mujeres con riesgo y la incidencia acumulada justo debajo del eje x. Las tablas de resumen que se incluyen debajo de las figuras muestran los intervalos de confianza del índice de DR acumulado a los 5 años o 10 años en el caso de aquellas mujeres que no presentaron DR una vez finalizados los 5 años de tratamiento. Para los pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) representados en la Figura 21, se han combinado los grupos de riesgo bajo e intermedio debido al reducido número de pacientes del grupo de bajo riesgo.

La población de bajo riesgo tiene pocas probabilidades de recurrencia entre los años 5 y 10 después de 5 años de terapia endocrina tal y como demuestran las curvas de incidencias acumuladas y las ratios de riesgos asociadas de cada grupo de riesgo. En contraposición, las poblaciones con riesgo intermedio y alto tienen un riesgo constante de recurrencia a distancia tardía después de 5 años de terapia endocrina. La diferencia en los resultados entre las poblaciones con nodos negativos y riesgo intermedio y alto se establece en los primeros 5 años (índice de DR = 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] para pacientes de riesgo alto y 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] para pacientes de riesgo intermedio) y persiste hasta los 10 años; sin embargo, los índices de recurrencia de los grupos de riesgo intermedio y alto después de 5 años de terapia endocrina son muy similares.

Figura 20A: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos negativos

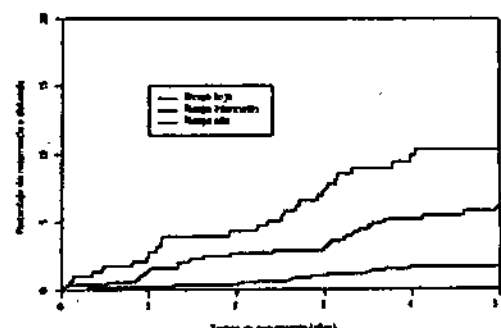


Grupo de riesgo	n	DR (95% CI)	IC (95% CI)	IC (95% CI)
Alto	366	307 (1,1)	375 (1,7)	303 (1,1)
Intermedio	311	248 (1,1)	313 (1,1)	308 (1,1)
Bajo	675	644 (1,1)	632 (1,1)	632 (1,1)

Resumen de datos de la Figura 20A: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos negativos

Índice de DR por grupo de riesgo hasta cinco años de finalización del tratamiento (95 % de intervalos de confianza)		
Alto	Intermedio	Bajo
13,2 % (9,6 % - 16,7 %)	4,7 % (2,9 % - 6,4 %)	2,1 % (1,1 % - 3,1 %)

Figura 20B: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos negativos

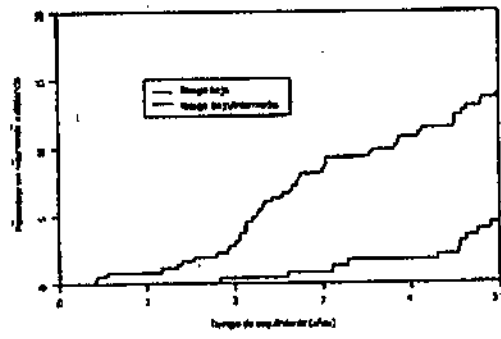


Grupo de riesgo	n	DR (95% CI)	IC (95% CI)	IC (95% CI)
Alto	227	301 (1,1)	254 (1,1)	225 (1,1)
Intermedio	190	478 (1,1)	443 (1,1)	387 (1,1)
Bajo	818	779 (1,1)	715 (1,1)	748 (1,1)

Resumen de datos de la Figura 20B: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos negativos

Índice de DR por grupo de riesgo cinco años después de la finalización del tratamiento sin DR (95 % de intervalos de confianza)		
Alto	Intermedio	Bajo
10,4 % (6,8 % - 14,1 %)	6,4 % (4,1 % - 8,7 %)	1,7 % (0,8 % - 2,6 %)

Figura 21A: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

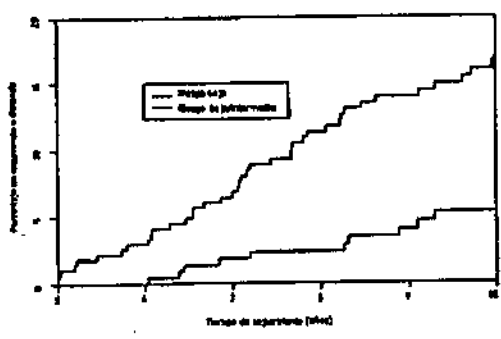


Grupo de riesgo	n	DR (95% CI)	IC (95% CI)	IC (95% CI)
Alto	351	349 (1,1)	337 (1,1)	313 (1,1)
Intermedio	235	233 (1,1)	228 (1,1)	226 (1,1)

Resumen de datos de la Figura 21A: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

Índice de DR por grupo de riesgo hasta cinco años de finalización del tratamiento (95 % de intervalos de confianza)	
Alto	Intermedio
13,8 % (10,1 % - 17,4 %)	4,4 % (1,7 % - 7,0 %)

Figura 21B: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)



Grupo de riesgo	n	DR (95% CI)	IC (95% CI)	IC (95% CI)
Alto	272	254 (1,1)	233 (1,1)	204 (1,1)
Intermedio	216	211 (1,1)	204 (1,1)	190 (1,1)

Dra. SILVINA CANELA  
DIRECTORA TECNICA  
BIOSYSTEM S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Apodado  
BIOSYSTEM S.A.



Resumen de datos de la Figura 21B: curvas de incidencias para recurrencia a distancia por grupo de riesgo de 0 a 5 años: Pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

Índice de DR por grupo de riesgo cinco años después de la finalización del tratamiento en DR (13 % de intervalos de confianza)	
ARN	De/información
HR (1.7) (1.4-2.1)	3.9% (2.8% - 4.4%)

**Conclusiones del análisis combinado**

El ROR se mostró para añadir información de pronóstico importante en el periodo de recurrencia tardía entre los años 5 y 10 después del diagnóstico y por encima de las variables clínicas estándar en el estudio combinado para pacientes que no presentaron recurrencia a distancia en cinco años. Utilizando grupos de riesgo definidos en la línea base de cada cohorte con un número específico de nodos, los grupos de riesgo se mostraron para clasificar todo el conjunto de pacientes en grupos con un riesgo de recurrencia a distancia tardía significativamente diferente. Los análisis de grupos de riesgo continuo y basado en ROR mostraron información de pronóstico similar en varios subgrupos. No se observaron diferencias materiales entre los resultados utilizando pacientes con nodos HER2 negativos en comparación con todos los pacientes.

Tanto en el estudio TransATAC como en el ABCSG-8, se había demostrado que el ROR añade información de pronóstico, más allá y por encima de las variables de tratamiento y clínicas estándar, tanto cuando se incluye como una medida continua como cuando se incluye utilizando tres grupos de riesgo predefinidos. Los dos estudios presentaban perfiles de riesgo distintos, en el sentido de que el índice de episodios era mayor en el estudio TransATAC que en el estudio ABCSG-8: esto puede verse fácilmente al comparar la DRFS (%) de los grupos de control de ATAC (3.8 %) y ABCSG8 (92.5 %) indicados en la bibliografía<sup>10</sup>. Este análisis combinó los datos de los dos estudios concediéndoles la misma importancia para generar perfiles de riesgo que se espera que sean más generalizables para otras poblaciones de pacientes que los resultados de los estudios individuales.

**Estudio 1: previsión de riesgo de recurrencia a distancia en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos y nodos positivos o nodos negativos en las primeras fases tratado con anastrozol o tamoxifeno: un estudio TransATAC**

**Diseño del estudio**

El estudio de validación clínica se diseñó para validar que el riesgo de recurrencia (ROR) ofrece información de pronóstico adicional sobre la supervivencia sin recurrencia a distancia (DRFS) más allá y por encima de las variables clínicas estándar utilizando todas las muestras de pacientes disponibles. Este estudio utilizó ARN aislado de tejido de tumor de mama FFPE de un subconjunto de los pacientes que participaron en el ensayo ATAC<sup>10</sup>. El ensayo ATAC incluyó a 3066 pacientes de tres grupos de ensayo (1:1:1) en los que los pacientes se dispusieron de forma aleatoria para recibir 5 años de terapia endocrina con 1 mg de anastrozol (es decir, erlenmister) y un placebo de tamoxifeno, 20 mg de tamoxifeno y placebo de anastrozol o una combinación de tamoxifeno y erlenmister. El grupo de tratamiento de la combinación se desvirtuó tras el análisis inicial porque no mostró ninguna ventaja en cuanto a eficacia o tolerabilidad con respecto al tamoxifeno solo. Se ha informado recientemente de que en un seguimiento medio a 10 años de los grupos de monoterapia del ensayo ATAC se cumplían los requisitos de la FDA en cuanto a información sobre eficacia y seguridad actualizada. En el caso de pacientes con receptores hormonales positivos, hubo una importante mejora en los valores de la DFS (HR = 0.66), la RFS (HR = 0.79) y la DRFS (HR = 0.85) en los pacientes tratados con anastrozol, en comparación con el tamoxifeno, en este análisis. Las diferencias absolutas en la supervivencia sin recurrencia a distancia entre el anastrozol y el tamoxifeno aumentaron con el tiempo del 2,7 % a 5 años hasta el 4,3 % a 10 años. El proyecto TransATAC se inició en 2002 en virtud del protocolo TA01 para establecer retrospectivamente un banco de tejidos de bloques FFPE de archivos histopatológicos de pacientes de ATAC<sup>10</sup>.

Se obtuvieron un total de 2008 bloques de las 4160 mujeres con cáncer de mama con receptores hormonales positivos distribuidas aleatoriamente en los grupos de monoterapia del ensayo ATAC. De dichos bloques FFPE, 1372 se obtuvieron de pacientes del Reino Unido, y contenían suficiente tumor invasivo para el análisis con la prueba Oncotype Dx® de Genomic Health®. La Recurrence Score® (RS) de Oncotype Dx se determinó a partir de los bloques FFPE, y los resultados del estudio validaron clínicamente la RS para calcular la supervivencia sin recurrencia a distancia en pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama HR+ tratado con anastrozol o tamoxifeno. El ARN restante del estudio de Oncotype Dx se envió al Royal Marsden Hospital de Londres, donde se almacenó a -70 °C. Un total de 1017 pacientes del estudio de Oncotype Dx tuvieron > 500 ng de ARN restantes y NanoString le realizó pruebas como parte del estudio de validación clínica de NanoString.

Este estudio utilizó los subtipos intrínsecos generados por la prueba y evaluó dos versiones del ROR utilizando un enfoque secuencial predefinido. Los dos ROR distintos, ambos de 0 a 100, se calcularon utilizando los 50 genes de prueba publicados anteriormente o un subconjunto de 45 genes. En cada caso, los coeficientes se calcularon a partir de un modelo de Cox que incluye la corrección de Pearson para los 50 o 45 genes utilizados para calcular cada subtipo intrínseco, un índice de proliferación y el tamaño del tumor. Todos los análisis se realizaron con datos de seguimiento a 10 años.

2015-01 LBL-10019-02

Dra. SAVINA CANELA  
DIRECTORA CLÍNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Díez  
Gerente  
BIOSYSTEMS S.A.

La variable de valoración principal fue la supervivencia sin recurrencia a distancia (DRFS). Esto se definió como el intervalo desde el diagnóstico hasta la recurrencia a distancia o el fallecimiento por cáncer de mama. La variable de valoración secundaria fue la supervivencia sin recurrencia (RFS). Esto se definió como el intervalo desde el diagnóstico hasta la primera recurrencia (local, regional o a distancia) o el fallecimiento por cáncer de mama.

Utilizando todas las muestras de pacientes disponibles, se adoptaron modelos de riesgos proporcionales (PH) de Cox multivariantes para evaluar el objetivo principal en pruebas secuenciales de ROR basadas en 50 y 45 genes. El modelo incluía las covariables clínicas estándar (edad, grado del tumor, tamaño del tumor, estado de los nodos, terapia adyuvante). A continuación, se adoptó un modelo de Cox y se utilizó una prueba de ratio de probabilidad para probar si el ROR añade información de pronóstico adicional estadísticamente importante ( $\alpha = 0,05$ ) más allá y por encima de la contienda en el Índice de tratamiento clínico (CTS). El CTS es una combinación optimizada de factores clinicopatológicos desarrollada por el investigador clínico como una medida de la patología estándar<sup>10</sup>. Se repitieron los análisis principales para distintos subconjuntos de pacientes (todos, nodos negativos, nodos positivos o solo HER2 negativo) y variables de valoración (DRFS o RFS).

Se utilizaron modelos de Cox (sin incluir el CTS) para pronosticar el riesgo de DR a 10 años como función del ROR para cada uno de los pacientes con nodos negativos y nodos positivos. Según estos pronósticos del modelo, se definieron tres grupos de riesgo: 1

- Riesgo bajo: < 10 % de probabilidad de DR a 10 años
- Riesgo intermedio: 10-20 % de probabilidad de DR a 10 años
- Riesgo alto: > 20 % de probabilidad de DR a 10 años

**Análisis**

Se generaron diagramas Kaplan-Meier para cada grupo de riesgo. Se realizaron pruebas de ratio de probabilidad (utilizadas para comparar la idoneidad de dos modelos estadísticos), tal y como se describe en el análisis principal, para la prueba Oncotype Dx de Genomic Health (RS, Recurrence Score) y la prueba basada en la inmunohistoquímica (IHC4) del investigador principal. Estos resultados se compararon con los obtenidos para el ROR para determinar hasta qué punto ofrece cada sistema de valoración información de pronóstico adicional, más allá y por encima del CTS. No profundizaremos en los resultados de IHC4, ya que son difíciles de comparar con las otras pruebas porque la prueba IHC4 se empleó utilizando los datos del estudio TransATAC.

Tabla 26: resumen de las características clínicas y demográficas

Característica	Estudio actual (n = 1 007)		Estudio valid del que se obtuvo el ARN (n = 1 231)	Grupos de riesgo clínico de ATAC no incluidos (n = 2 529)
	Nº de pacientes	% de pacientes		
<b>Estado de los nodos</b>				
Negativo	701	70%	71%	68%
Positivo	268	27%	25%	25%
Desconocido	38	4%	4%	7%
<b>Tamaño del tumor</b>				
< 1 cm	135	14%	8%	7%
1-2 cm	523	52%	31%	30%
2-3 cm	233	23%	33%	33%
> 3 cm	93	9%	13%	13%
<b>Grado del tumor</b>				
Buena	213	21%	27%	25%
Mediocre	601	60%	57%	56%
Mala	193	19%	16%	17%
<b>Edad</b>				
Promedio	64,4 años		64,3	65,

Tabla 27: características clínicas adicionales

Característica	Número de pacientes	% de pacientes
<b>Subtipo</b>		
De tipo basal	6	1%
HER2 amplificado	41	4%
Luminal A	692	69%
Luminal B	265	26%
<b>Tratamiento</b>		
Anastrozol	513	51%
Tamoxifeno	494	49%
<b>Recurrencias</b>		
Cualquiera	210	21%
A distancia	160	16%
<b>Estado de HER2</b>		
Negativo	688	69%
Positivo	119	12%



9 29/3

**Resultados**

Las pruebas del análisis principal demostraron que el ROR ofrece información de pronóstico adicional sobre la supervivencia sin recurrencia a distancia más allá y por encima de las variables clínicas estándar (CTS). Todos los datos obtenidos sobre ROR que se indican a continuación se basan en 46 genes, ya que esta es la base para el ROR según lo indicado en la prueba Prosigna.

Tabla 28: pruebas del análisis principal del ROR

Modelo nulo	Modelo alternativo	ALR $\phi^2$	Valor-p en $\phi^2$
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

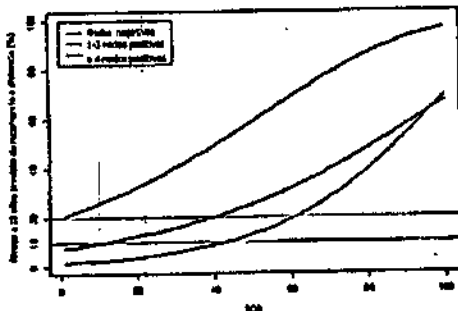
Los análisis secundarios demostraron que el ROR está estrechamente relacionado con la supervivencia sin recurrencia a distancia y añade información de pronóstico más allá del CTS en diversos subgrupos importantes desde el punto de vista clínico.

Tabla 29: repetición de las pruebas del análisis principal para subgrupos predefinidos

Grupo sujeto	Variable de valoración	N.º de pacientes	N.º de episodios	CTS+ROR frente a CTS	
				ALR $\phi^2$	Valor-p en $\phi^2$
Todos	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2 negativos	DRFS	888	131	78,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,8	< 0,0001
Nodos negativos	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Nodos positivos	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
Nodos HER2 negativos Nodos negativos	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

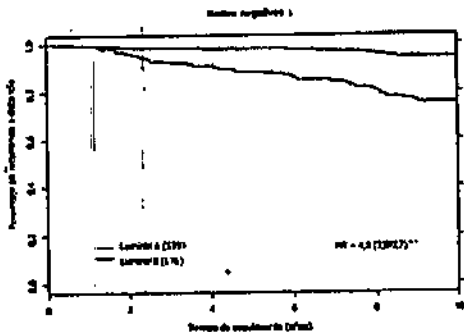
Los análisis principal y secundario mostraron que el ROR guardaba una relación continua con la DRFS en todos los pacientes y en todos los subgrupos.

Figura 22: cálculo del riesgo de recurrencia a distancia previsto en diez años mediante el análisis de ROR en el grupo de estado de los nodos



Los análisis secundarios demostraron que los subtipos luminal A y luminal B presentaban resultados muy diferentes estadísticamente dentro de cada subgrupo de pacientes definido según el estado de los nodos.

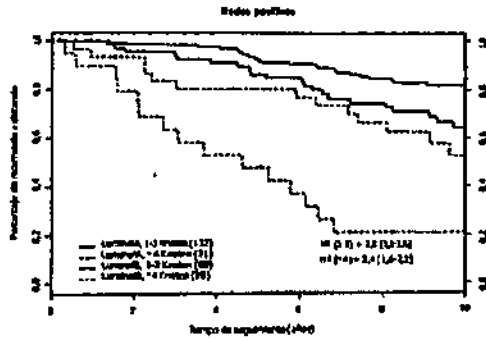
Figura 23: curvas de Kaplan-Meier de DRFS de pacientes con nodos negativos según el subtipo intrínseco



2015-01 LBL-10010-02

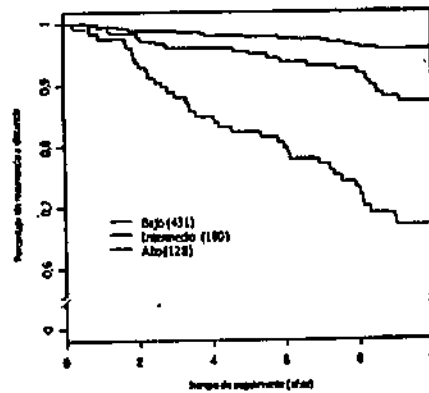
Dra. SILVIA MANUELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 37421  
BIOSYSTEMS S.A.

Figura 24: curvas de Kaplan-Meier de DRFS de pacientes con nodos positivos según el subtipo intrínseco



Las Figuras 25 y 26 demuestran que, en cada categoría nodal, el riesgo clínico absoluto de aquellos pacientes pronosticados como de bajo riesgo difería considerablemente del riesgo clínico absoluto de los pacientes pronosticados como de alto riesgo: en los pacientes pronosticados como de bajo riesgo se habían observado índices de DR a 10 años de menos del 10 %, mientras que en los pacientes pronosticados como de alto riesgo se habían observado índices de DR de 10 años superiores al 30 %.

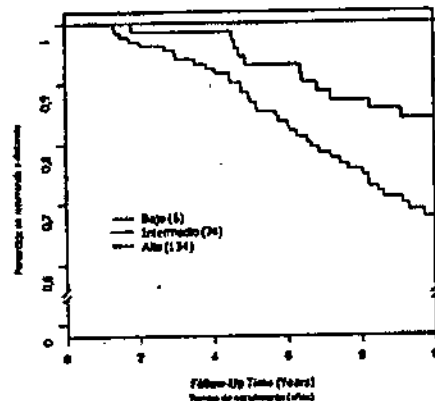
Figura 25: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos, sin incluir CTS



Resumen de datos de la Figura 25: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos, sin incluir CTS

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años (95 % de CI)
Bajo	431 (58%)	17	86 % (84 %-88 %)
Intermedio	180 (24%)	22	88 % (81 %-92 %)
Alto/high	128 (17%)	38	67 % (59 %-76 %)
Total	739 (100%)	77	

Figura 26: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con 1-3 nodos positivos en CTS



Lic. Alejandro Díez  
Fondecodo  
BIOSYSTEMS S.A.

6 2 9 '31



Resumen de datos de la Figura 26: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con 2-3 nodos positivos sin CTS

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	6 (3%)	0	100 % [n/a]
Intermedio	74 (35%)	11	84 % [76 %-93 %]
high/Alto	134 (63%)	38	68 % [59 %-77 %]
Total	214 (100%)	49	

**Comparación del ROR con RS**

De las 1007 muestras con ROR, se disponía de resultados de la prueba Oncotype Dx para las 1007 muestras, pero solo se disponía de resultados de IHC para 940 muestras. Para permitir la comparación de las tres pruebas, los resultados de esta sección se basan en las 940 muestras que tenían resultados de pruebas con los tres métodos (sin embargo, no incluimos aquí el IHC4). Se presentan las pruebas de ratio de probabilidad para la adición de una única variable, de modo que para que la información añadida sea importante estadísticamente ( $\alpha = 0,05$ ), el cambio en la estadística  $\chi^2$  de grado de libertad 1 debe ser mayor que 3,84. Las siguientes figuras muestran la información añadida cuando la prueba de pronóstico se añade a otra prueba de pronóstico y al CTS de forma secuencial. En cada adición, la información añadida se mide según el cambio en  $\chi^2$ .

ROR añadido a RS, además de CTS: información de pronóstico

Figura 27: Información de pronóstico para DRFS más allá del CTS en todos los pacientes (n = 940)

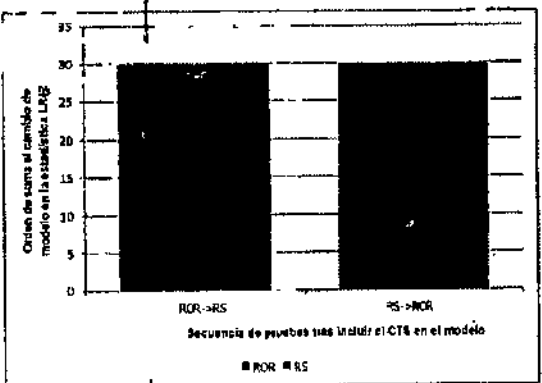


Figura 28: Información de pronóstico para DRFS más allá del CTS en pacientes con nodos negativos (n = 683)

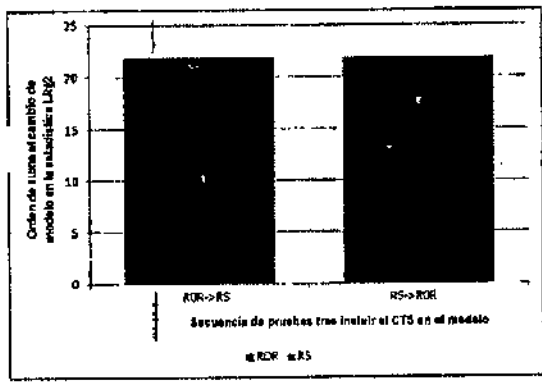


Figura 29: Información de pronóstico para DRFS más allá del CTS en los pacientes con nodos positivos (n = 257)

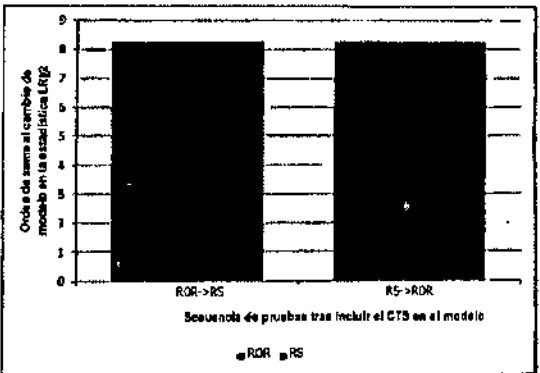
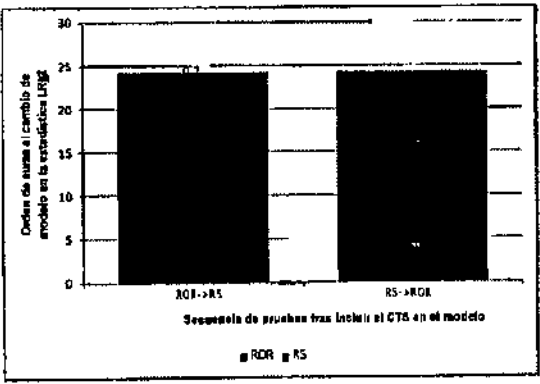


Figura 30: Información de pronóstico para DRFS más allá del CTS en pacientes con nodos negativos y HER2 negativo (n = 649)



Las figuras de la 27 a la 30 muestran la información añadida más allá del CTS cuando las dos pruebas de pronóstico se añaden de forma secuencial. En cada adición, la información añadida se mide según el cambio en la estadística  $\chi^2$ . Por ejemplo, cuando el ROR fue la primera prueba en añadirse (tras la inclusión del CTS [todos los datos de los pacientes], el cambio en la estadística  $\chi^2$  fue de 27,4. Con el CTS y el ROR en el modelo, la adición de RS supuso un cambio en la estadística  $\chi^2$  de 2,5, que no es significativo (el valor crítico para la prueba de  $\chi^2$  con un 1 grado de libertad es de 3,84), es decir, una vez que el CTS y el ROR están en el modelo, RS no añade información importante. Sin embargo, si RS fue la primera prueba en añadirse, todavía existía información en el ROR que no estaba incluida en la combinación de CTS y RS. Ambas pruebas muestran importancia en el pronóstico cuando se añaden al CTS de pacientes con nodos positivos, pero ninguna de las pruebas muestra importancia como prueba añadida secundaria, posiblemente debido al menor tamaño de la muestra. Para el subconjunto de pacientes con nodos negativos y HER2 negativo, RS no añade información de pronóstico importante al CTS + ROR. Por otra parte, el ROR añade información de pronóstico importante al CTS + RS ROR frente a RS: resultado de los grupos de riesgo

Con el objeto de comparar cómo separaban a los pacientes las dos pruebas según el riesgo, se definieron grupos de riesgo según el cálculo del riesgo de recurrencia a distancia a 10 años de cada prueba dentro de la población de TransATAC. En cada prueba se seleccionaron umbrales de índice de riesgo para definir los grupos de riesgo según los resultados de nuestro estudio TransATAC para definir grupos de riesgo que contuvieran pacientes con el mismo riesgo. Para lograr estos grupos de riesgo comparables, los puntos de corte utilizados para Oncotype DX fueron distintos que los utilizados por Genomic Health. En cada prueba, el grupo de riesgo bajo se definió prospectivamente como los pacientes con un riesgo de recurrencia estimado inferior al 10 %. En cada prueba, el grupo de riesgo intermedio se definió prospectivamente como los pacientes con un riesgo de recurrencia estimado entre el 10 % y el 20 %. En cada prueba, el grupo de riesgo alto se definió prospectivamente como los pacientes con un riesgo de recurrencia estimado superior al 20 %. La siguiente figura resume los tamaños y los resultados de los grupos de riesgo definidos en cada prueba.

La Figura 31 ilustra el resultado de que Prosigna asignara un 26 % menos de pacientes al grupo de riesgo intermedio que Oncotype DX (180 pacientes frente a 243 pacientes). Además, Prosigna asignó más pacientes al grupo de alto riesgo que Oncotype DX; sin embargo, los grupos de bajo riesgo y alto riesgo definidos en cada prueba presentan resultados similares, tal como ilustran las curvas de Kaplan-Meier superpuestas. Esta observación llevó a los investigadores independientes de

Handwritten signature/initials.

Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

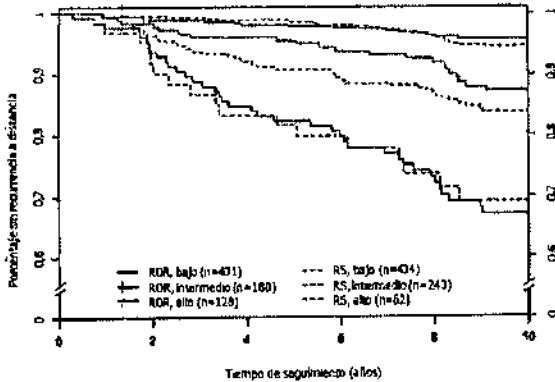
Lic. Alejandro Díez  
Apoderado  
BIOSYSTEMS S.A.

Handwritten signature/initials.

82

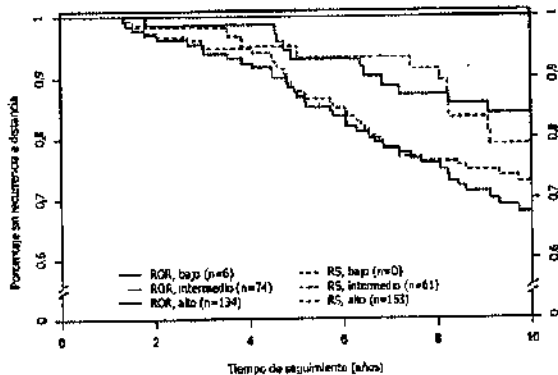
nuestro estudio TransATAC a concluir que Prosigna asignó menos pacientes al grupo de riesgo intermedio que RS de Oncotype DX, con una separación equivalente o superior entre los grupos de bajo y alto riesgo.

Figura 31: el ROR de Prosigna identificó muchos más pacientes de alto riesgo y menos pacientes de riesgo intermedio que RS de Oncotype DX para pacientes con nodos negativos.



Al utilizar el ROR solo en pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos, se pronosticó que 6 pacientes tendrían un riesgo de recurrencia a distancia < 10 %. ninguno de estos pacientes sufrió episodios durante el transcurso del estudio. Uno de estos pacientes fue observado durante 7,9 años, y ninguno de los demás presentó DR en al menos 9,9 años de seguimiento, lo que indica que los pacientes con nodos positivos pronosticados como de bajo riesgo eran realmente de bajo riesgo. Las pruebas logrank no se utilizaron para la comparación, ya que no hubo grupos de bajo riesgo para RS.

Figura 32: comparación de la clasificación de grupos de riesgo de DRFS a 10 años sin utilizar CTS: pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) (ROR frente a RS)



Conclusiones del estudio clínico 1

El análisis principal mostró que el ROR añadió información de pronóstico importante más allá de las covariables clínicas estándar (CTS) en todos los pacientes y en todos los subgrupos predefinidos clínicamente relevantes. Se mostró que el ROR subdividía a los pacientes en 3 grupos de riesgo, con resultados muy diferentes estadísticamente en los pacientes con nodos negativos. Se mostró que los subtipos intrínsecos luminal A y luminal B tienen DRFS y RFS significativamente diferentes, independientemente del estado de los nodos. En comparación con el indicador de pronóstico RS (Recurrencia Score de 21 genes de Oncotype Dx), el ROR añadió información de pronóstico más allá de RS en todos los pacientes y en subgrupos clínicamente importantes. Además, en el grupo de nodos negativos, ROR duplicó el número de pacientes asignados al grupo de alto riesgo, y redujo enormemente el número de pacientes asignados al grupo de bajo y alto riesgo en comparación con la RS.

*[Handwritten signature]*

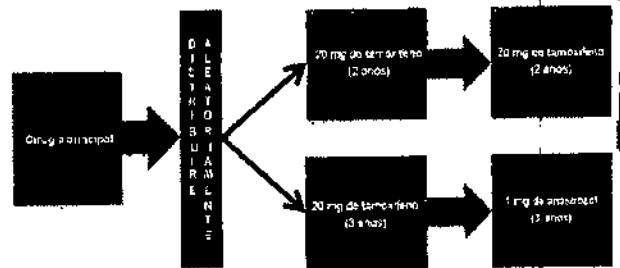
Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MESA 4 421  
BIOSYSTEMS S.A.

Estudio 2: Pronóstico para pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama de receptores hormonales positivos que reciben únicamente terapia sistémica adyuvante utilizando la prueba Prosigna de NanoString: un estudio ABCSG-8

Diseño del estudio

La cohorte del estudio consta de muestras de tejidos de tumor de mama FFPE obtenidas y archivadas de forma retrospectiva en el banco de tumores de ABCSG, de pacientes que participaron entre 1995 y 2004 en el ensayo ABCSG-8<sup>10</sup>. Se asignó aleatoriamente un total de 3901 mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama HR+ en las primeras fases antes del tratamiento a dos años de tamoxifeno adyuvante seguidos de tres años de Arimidex® (anastrozol) o cinco años de tamoxifeno adyuvante. La estructura del tratamiento del ensayo se muestra en la Figura 33

Figura 33: esquema del diseño del estudio del ensayo ABCSG-8



La cohorte de validación representa la fracción de la cohorte de ABCSG-8 evaluable para la que pudieron obtenerse especímenes de tejido del banco de tumores de ABCSG archivados de forma retrospectiva y para la que pudo obtenerse el consentimiento informado, o el paciente había fallecido. Los pacientes que cumplen los criterios de idoneidad para el ensayo original se excluyeron únicamente porque el tejido no estaba disponible para realizar la prueba de NanoString o porque no se pudo obtener un nuevo consentimiento del paciente. Todas las muestras disponibles con un bloque tumoral y consentimiento del paciente se probaron en este estudio.

Este estudio utilizó los subtipos intrínsecos generados por la prueba y evaluó el ROR utilizando un plan de análisis predefinido. El ROR, que va de 0 a 100, se calculó utilizando un subconjunto de 46 genes de los 50 genes de prueba anteriormente publicados<sup>11</sup>. Los coeficientes de ROR se calcularon a partir de un modelo de Cox que incluye la correlación de Pearson con los 46 genes utilizados para determinar cada subtipo intrínseco, un índice de proliferación y el tamaño bruto del tumor. Todos los análisis se realizaron con datos de seguimiento máximo.

La variable de valoración principal fue la supervivencia sin recurrencia a distancia (DRFS). Esto se definió como el intervalo desde el diagnóstico hasta la recurrencia a distancia o el fallecimiento por cáncer de mama. La variable de valoración secundaria fue la supervivencia sin recurrencia (RFS). Esto se definió como el intervalo desde el diagnóstico hasta la primera recurrencia (local, regional o a distancia) o el fallecimiento por cáncer de mama.

Utilizando todas las muestras de pacientes disponibles, se adoptaron modelos de riesgos proporcionales (PH) de Cox multivariantes para evaluar el objetivo principal en pruebas secuenciales de ROR. El modelo incluía las covariables clínicas estándar (edad, grado del tumor, tamaño bruto del tumor, estado de los nodos, terapia adyuvante). A continuación, se adoptó un modelo de Cox y se utilizó una prueba de ratio de probabilidad para probar si el ROR añade información de pronóstico adicional estadísticamente importante ( $\alpha = 0,05$ ) más allá y por encima de la contenida en el índice de tratamiento clínico (CTS). El CTS es una combinación optimizada de factores clinicopatológicos desarrollada como una medida de la patología estándar<sup>12</sup>. Se repitieron los análisis principales para distintos subconjuntos de pacientes (todos, nodos negativos, nodos positivos o solo HER2 negativo) y variables (DRFS o RFS).

Análisis

Se utilizó un enfoque secuencial en el que el principal objetivo científico era demostrar que el ROR añade información de pronóstico importante, más allá y por encima de las variables clínicas estándar. El objetivo principal añadió un requisito adicional para demostrar que la clasificación de los riesgos en uno de los tres grupos (bajo/intermedio/alto) añade información de pronóstico importante, más allá y por encima de las variables clínicas estándar. Para cumplir este requisito, debían demostrarse los dos aspectos siguientes:

- Mostrar que el ROR continuo añade valor de pronóstico, más allá y por encima de las variables clínicas estándar
- Si se rechaza la hipótesis nula de no contar con información de pronóstico, mostrar que las categorías de riesgo basadas en el ROR añaden valor de pronóstico, más allá y por encima de las variables clínicas estándar

Lic. Alejandro Diez  
Moderador  
BIOSYSTEMS S.A.

*[Handwritten signature]*

6293



Utilizando todas las muestras de pacientes disponibles, se adoptaron modelos de riesgos proporcionales (PH) de Cox multivariantes para evaluar el objetivo principal en pruebas secuenciales de ROR, seguidas por categorías de riesgos predefinidas basadas en el ROR. Los modelos incluyeron las siguientes covariables clínicas estándar categóricas (con valores posibles):

- Edad ( $\geq 65$  o  $< 65$ )
- Grado (G1 o G2/GX)
- Tamaño bruto del tumor (T1, T2/T3)
- Estado de los nodos (N0, N+(1-3), N+( $\geq 4$ ))
- Terapia adyuvante (solo tamoxifeno, o tamoxifeno + anastrozol)

donde N0 indica pacientes con nodos negativos, N+(1-3) indica pacientes con nodos positivos con 1-3 nodos positivos y N+( $\geq 4$ ) indica pacientes con nodos positivos con 4 o más nodos positivos. T1 indica un tumor de  $\leq 2$  cm, T2 indica un tumor de más de 2 cm pero de no más de 5 cm y T3 indica un tumor de más de 5 cm. Solo hubo 14 especímenes T3 en el estudio, de modo que se combinaron con los especímenes T2. Los tumores bien diferenciados (G1) se compararon con la combinación de tumores lobulares GX y moderadamente diferenciados (G2). Los tumores lobulares GX se trataron como tumores G2 en el análisis, porque los tumores G2 son el grado más común en esta población de pacientes de uso previsto.

Estas covariables se introducen en el modelo en forma de índice de tratamiento clínico (CTS). Para obtener el CTS, se adoptó el siguiente modelo:

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

Donde las  $z$  representan las variables clínicas y de tratamiento indicadas anteriormente y el CTS se definió utilizando los cálculos de las  $\gamma$  obtenidos previamente; es decir,

$$S = \sum_j z_j \gamma_j$$

Se probó la asunción de riesgos proporcionales utilizando los residuales de Schoenfeld.

Los pacientes incluidos en el estudio de validación tenían características similares a los del estudio ACBSG-8 original.

Tabla 30: resumen de características clínicas

Característica	Valor	Incluido (n = 1.478)		No incluido (n = 2.236)		Total (n = 3.714)	
		N*	%	N*	%	N*	%
Tratamiento	Solo tamoxifeno	731	50,1%	1128	50,2%	1859	50,2%
	Tamoxifeno + Anastrozol	737	50,2%	1125	50,2%	1865	50,2%
Estado de ER	Positivo	1484	99,1%	2199	98,7%	3683	99,0%
	Desconocido	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Grado	G1	771	52,2%	1068	47,8%	1839	50,0%
	G2	1152	77,9%	1868	83,9%	3020	81,9%
	GX	55	3,7%	109	4,8%	164	4,4%
Estado de los nodos	N0	1047	70,9%	1723	76,7%	2770	74,6%
	N+(1-3)	362	24,5%	448	20,0%	810	21,8%
	N+( $\geq 4$ )	49	3,3%	64	2,8%	113	3,0%
Estado de PyR	Positivo	760	51,5%	1224	54,7%	1984	53,9%
	Desconocido	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
	T1	1037	70,2%	1715	76,7%	2752	74,2%
Tamaño de tumor	T2	427	28,8%	472	21,0%	899	24,2%
	T3	14	0,9%	19	0,8%	33	0,9%
	Edad	Medio	63		74		137
	Intervalo	41-79		41-80		41-80	

\* Incluye un paciente con  $> 9$  nodos positivos

Tabla 31: características clínicas adicionales

Característica	Valor	Número de pacientes	% de pacientes
Subtipo intrínseco de NanoString	Luminal A	1.004	67,9%
	Luminal B	418	28,3%
	HER2 enriquecido	48	3,2%
	De tipo basal	8	0,5%
Recurrencias	A distancia	155	10,5%
	Cualquiera	194	13,1%
Estado de HER2	Negativo	1.397	94,5%
	Positivo	77	5,2%
	Desconocido	4	0,3%

Resultados

De los 1620 tejidos disponibles para las pruebas, 25 (1,5 %) no pasaron la revisión patológica predefinida para la búsqueda del tumor adecuado, 73 de las 1595 muestras de tejido (4,6 %) con tejido invasivo viable no cumplieron las especificaciones de QC predefinidas sobre el ARN extraído, y 44 de las 1522 muestras de ARN (2,9 %) no cumplieron las especificaciones de QC de la prueba para los resultados de Prosigna, lo que deja un total de 1478 (91,2 %) disponibles para el análisis.

De los 1478 pacientes disponibles para el análisis, 155 tuvieron recurrencias a distancia y 184 tuvieron recurrencia local o a distancia o murieron de cáncer de mama. El seguimiento medio en el ensayo fue de 10 años.

Las pruebas del análisis principal demostraron que el ROR ofrece importante información de pronóstico adicional sobre la supervivencia sin recurrencia a distancia, más allá y por encima de las variables clínicas estándar (CTS).

Tabla 32: resumen de las pruebas del análisis principal

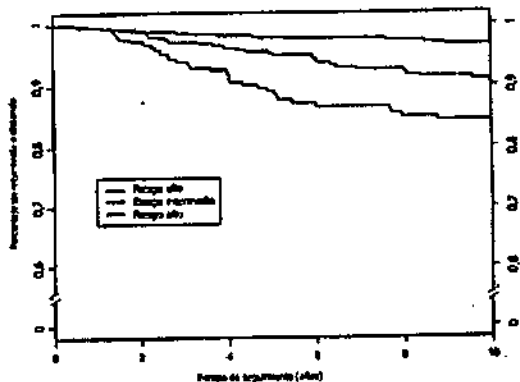
Modelo nulo	Modelo alternativo	ALR $\chi^2$	Valor crítico de $\chi^2$ (grados de libertad)	Valor-p en $\chi^2$
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Grupo de riesgo	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Los análisis secundarios demostraron que el ROR está estrechamente relacionado con la supervivencia sin recurrencia a distancia y añade información de pronóstico más allá del CTS en diversos subgrupos importantes desde el punto de vista clínico.

Tabla 33: repetición de las pruebas del análisis principal para subgrupos predefinidos

Grupo sujeto	N.º de pacientes	N.º de episodios	CTS+ROR frente a CTS	CTS+grupo de riesgo frente a CTS
			ALR $\chi^2$ (valor cr. = 3,84)	ALR $\chi^2$ (valor cr. = 5,99)
Todos	1.478	155	53,49	34,12
HER2 negativo	1.397	145	47,50	29,94
N0	1.047	85	25,57	23,36
N0, HER2 negativo	984	78	21,69	20,32
N+(1-3)	362	59	25,99	15,94
N+( $\geq 4$ ), nodos HER2 negativos	367	56	22,75	10,75

Figura 34: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos



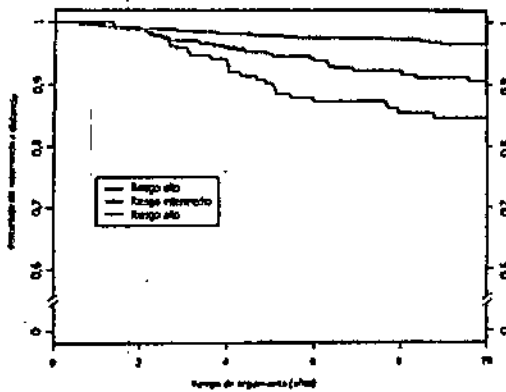
Resumen de datos de la Figura 34: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	487 (47%)	15	98,6 % (94,4 %-100,0 %)
Intermedio	335 (32%)	28	90,4 % (85,3 %-95,3 %)
Alto	225 (21%)	32	84,3 % (78,4 %-89,8 %)
Total	1.047 (100%)	75	

Dra SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic Alejandro Díez  
Ejecutivo  
BIOSYSTEMS S.A.

Figura 35: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos HER2 negativos

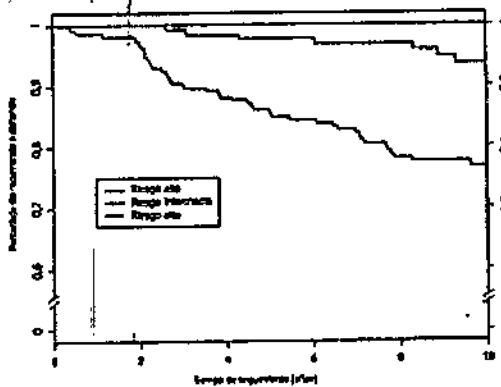


Resumen de datos de la Figura 35: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos negativos HER2 negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	474 (48%)	15	96,5 % [94,3 %-97,8 %]
Intermedio	311 (32%)	27	90 % [85,8 %-93,1 %]
Alto	189 (20%)	27	84,7 % [78,4 %-89,3 %]
Total	984 (100%)	69	

La Figura 36 muestra los estimadores Kaplan-Meier según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos), y la Figura 37 muestra los mismos estimadores para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) y nodos HER2 negativos. Los resultados con y sin los pacientes HER2 positivos son similares.

Figura 36: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)



Resumen de datos de la Figura 36: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

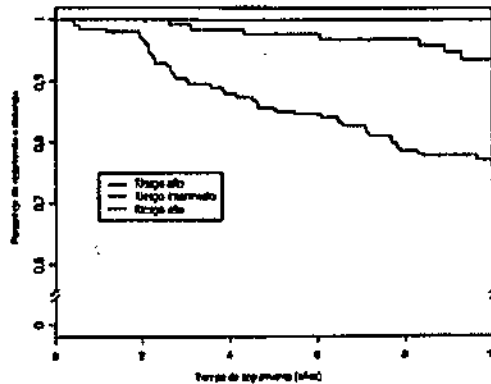
Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	15 (4%)	0	100 % [78,2 %-100 %]*
Intermedio	143 (37%)	7	83,6 % [80,8 %-87 %]
Alto	224 (59%)	48	75,8 % [69,9 %-81,4 %]
Total	382 (100%)	55	

\* Intervalo de confianza calculado con el método de Clopper-Pearson

*Handwritten signature*

Dra SILVIA CANELA  
DIRECTORA CLINICA  
MESA DE PRON. MED.  
BIOSYSTEMS S.A.

Figura 37: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) HER2 negativos



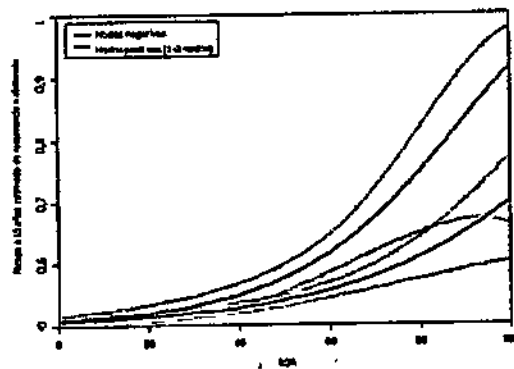
Resumen de datos de la Figura 37: DRFS según el grupo de riesgo para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) HER2 negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años [95 % de CI]
Bajo	15 (4%)	0	100 % [78,2 %-100 %]*
Intermedio	142 (39%)	7	83,6 % [80,8 %-86,8 %]
Alto	210 (57%)	43	78,1 % [69,0 %-87,8 %]
Total	367 (100%)	50	

\* Intervalo de confianza calculado con el método de Clopper-Pearson.  
Relación entre RQR y cálculo del riesgo

La Figura 38 muestra el riesgo de DR a 10 años como función del RQR con intervalos de confianza del 95 % según distintos modelos de riesgos proporcionales de Cox para cada grupo de pacientes con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos). Para los pacientes con nodos positivos (1-3 nodos), la asunción de riesgos proporcionales se incumplió al tener en cuenta todo el intervalo. La curva mostrada aquí para los pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) utiliza pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) con RQR en el intervalo 0-80, para los que se cumplió la asunción de riesgos proporcionales.

Figura 38: cálculo de riesgo de DR a diez años según categoría de los nodos con intervalos de confianza del 95 %



Dentro de cada subgrupo, el riesgo clínico absoluto de aquellos pacientes asignados a la categoría de bajo riesgo era sustancialmente diferente del riesgo clínico absoluto de los pacientes asignados a la categoría de alto riesgo.

La Tabla 34 muestra la distribución de pacientes con nodos negativos por intervalos discretos de RQR de 10 unidades. También se muestra el riesgo de DR a 10 años.

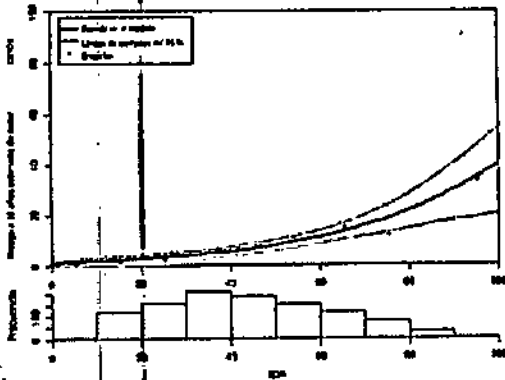
Lic. Alejandro Díez  
Apoderado  
BIOSYSTEMS S.A.

Tabla 34: distribución de pacientes con nodos negativos por intervalo de ROR de 10 unidades

Intervalo de ROR	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes	Riesgo de DR a 10 años (empírico)
1-10	7	0,7%	0,0%
11-20	16	1,5%	1,8%
21-30	35	4,8%	2,5%
31-40	206	20,0%	6,1%
41-50	183	17,5%	7,8%
51-60	152	14,5%	11,1%
61-70	118	11,1%	15,0%
71-80	77	7,1%	12,5%
81-90	28	2,7%	26,1%
91-100	4	0,4%	33,3%
Total	1047	100%	

La Figura 39 muestra la curva basada en modelos correspondiente a los pacientes con nodos negativos junto con los índices de supervivencia a 10 años calculados empíricamente para los 10 intervalos discretos, donde cada intervalo discreto está formado por todos los pacientes de los intervalos ROR de 10 unidades (1-10, 11-20, etc.). La siguiente curva es un histograma en el que se muestra la distribución de frecuencias por intervalo discreto.

Figura 39: comparación de cálculos empíricos y basados en modelos de riesgo de DR a diez años para pacientes con nodos negativos con distribución de ROR mostrada a continuación



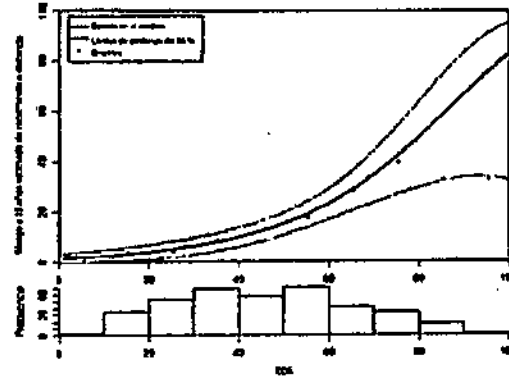
Para los pacientes con nodos negativos, los cálculos de riesgos proporcionales basados en modelos fueron similares a los cálculos empíricos en todo el intervalo. La Tabla 35 muestra la distribución de pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) por intervalos discretos de ROR de 10 unidades. También se muestra el riesgo de DR a 10 años.

Tabla 35: distribución de pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) por intervalo de ROR de 10 unidades

Intervalo de ROR	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes	Riesgo de DR a 10 años (empírico)
1-10	3	0,8%	0,0%
11-20	24	8,9%	3,8%
21-30	53	18,9%	4,1%
31-40	68	18,8%	6,5%
41-50	67	14,8%	11,7%
51-60	71	11,8%	12,8%
61-70	67	11,0%	29,0%
71-80	34	8,9%	28,5%
81-90	11	4,6%	33,0%
91-100	3	0,8%	33,3%
Total	337	100%	

La Figura 40 muestra la curva basada en modelos (utilizando pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) con ROR < 80) correspondiente a los pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) junto con los índices de supervivencia a 10 años calculados empíricamente para los 10 intervalos discretos, donde cada intervalo discreto está formado por todos los pacientes de los intervalos ROR de 10 (1-10, 11-20, etc.). La siguiente curva es un histograma en el que se muestra la distribución de frecuencias por intervalo discreto.

Figura 40: comparación de cálculos empíricos y basados en modelos de riesgo de DR a diez años para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) con distribución de ROR mostrada a continuación



Tanto la Tabla 35 como la Figura 40 muestran la estabilización del riesgo a 10 años observado en la parte superior del intervalo de ROR, que llevó al error en la asunción de riesgos proporcionales. No obstante, debe tenerse en cuenta que los tamaños de las muestras de los dos intervalos discretos por encima de 80 eran pequeños para los pacientes con nodos positivos (1-3 nodos) (17 pacientes de 81-90 y solo 3 de 91-100).

Comparación de subtipos intrínsecos luminal A y luminal B

La mayoría de los sujetos del estudio (96 %) eran luminal A o luminal B, lo que no fue accidental, pues estos subtipos intrínsecos predominan en pacientes con receptores hormonales positivos<sup>14</sup>.

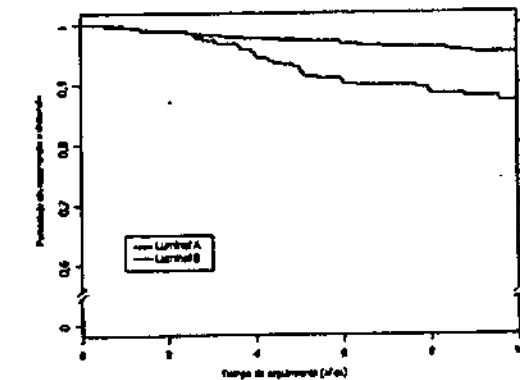
La Tabla 36 muestra los resultados de la prueba de ratio de probabilidad para mostrar el valor de pronóstico adicional correspondiente a DRFS que añade la distinción entre luminal A y luminal B más allá del CTS. La tabla también muestra la ratio de riesgos que compara pacientes luminal A y luminal B. Hubo un riesgo de recurrencia a distancia significativamente inferior para pacientes luminal A en los tres grupos.

Tabla 36: prueba de ratio de probabilidad para valor de pronóstico de DRFS en subtipos luminales

Subgrupo	Nº de pacientes	Nº de episodios	ΔLR <sup>2</sup>	Valor p en $\chi^2$	Ratio de riesgos de LumaA: LumaB (95 % de CI)
Todos	1.422	135	24,42	< 0,0001	0,42 (0,30-0,59)
N0	1.009	74	8,68	0,0018	0,47 (0,30-0,75)
N+(1-3)	385	51	14,94	0,0001	0,33 (0,18-0,58)

La Figura 41 muestra una comparación de DRFS por subtipo luminal para pacientes con nodos negativos, y la Figura 42 muestra la misma comparación para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos). En ambos grupos, hubo diferencias importantes entre la DRFS de los pacientes con cáncer luminal A y luminal B.

Figura 41: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos negativos



Dra. SILVIA CANELA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
MESA 421  
BIO SYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Asesorado  
BioSystems S.A.

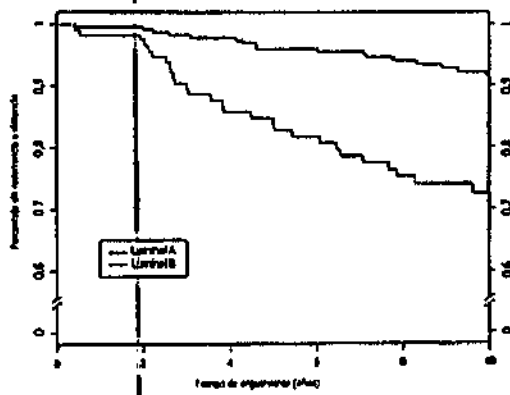


62913

Resumen de datos de la Figura 41: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos negativos

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años (95 % de CI)
Luminal A	725	32	85,1% (82,4%-88,3%)
Luminal B	284	32	87,2% (83,2%-90,3%)
Total	1.009	64	

Figura 42: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)



Resumen de datos de la Figura 42: curvas de Kaplan-Meier de DRFS según el subtipo intrínseco para pacientes con nodos positivos (1-3 nodos)

Grupo de riesgo	Número de pacientes	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años (95 % de CI)
Luminal A	248	17	81,3% (77,2%-84,2%)
Luminal B	118	28	72,5% (64,2%-79,1%)
Total	366	45	

La Tabla 37 muestra una tabla de índices de RFS a 10 años por subtipo luminal para los grupos de nodos negativos y positivos (1-3 nodos).

Tabla 37: índices de RFS a diez años por grupo de nodos y subtipo luminal

Estado de los nodos	Subtipo luminal	Número de pacientes (%)	Número de episodios a lo largo de 10 años	Porcentaje estimado sin recurrencia a distancia a 10 años (95 % de CI)
ND	Luminal A	725 (72)	44	83,0% (81,1%-84,5%)
	Luminal B	284 (28)	44	82,2% (77,8%-85,9%)
N+ (1-3)	Luminal A	248 (69)	21	89,1% (84,7%-92,4%)
	Luminal B	118 (37)	30	71,8% (62,2%-77,4%)

Para cada población de pacientes con nodos negativos y nodos positivos (1-3 nodos), la diferencia entre pacientes luminal A y luminal B era significativa.

**Conclusiones del estudio clínico 2**

Se demostró que el ROR añade importante información de pronóstico, más allá y por encima de las variables de tratamiento y clínicas estándar, tanto cuando se incluye como medida continua como cuando se incluye utilizando tres grupos de riesgo predefinidos. El grupo de bajo riesgo tuvo una DRFS a 10 años muy por encima del 80 %, tal como se había previsto. El grupo de alto riesgo tuvo una DRFS a 10 años del 80 %, que fue más de lo previsto (se había previsto que fuera claramente inferior al 80 %). Los valores de referencia utilizados para definir grupos de riesgo se basaron en la cohorte TransATAC, que tiene mayor riesgo que la cohorte actual, lo que crea un "grupo de alto riesgo" con un riesgo general menor que el previsto. El ROR (continuo y basado en grupos de riesgo) mostró una información de pronóstico similar en varios subgrupos. El modelo de riesgo continuo se ajusta con precisión a los índices empíricos de recurrencia tanto en las poblaciones de pacientes con nodos negativos como en las de nodos positivos (1-3 nodos). La mayoría de los pacientes (el 96 %) del estudio tenían tumores de uno de los dos subtipos luminales (luminal A o luminal B). En todos los grupos de estados de los nodos, la distinción entre luminal A y luminal B añadió información de pronóstico sobre DRFS.

**Resumen de estudios clínicos combinados**

Los resultados son generalizables para su uso distribuido, pues los resultados se enviaron a diferentes laboratorios y se analizaron en diferentes laboratorios en los dos estudios de validación clínica. Se demostró que el ROR añade importante información de pronóstico para DRFS a 10 años, más allá y por encima de las variables de tratamiento y clínicas estándar, tanto cuando se incluye como medida continua como cuando se incluye utilizando tres grupos de riesgo predefinidos. Además, en un análisis post-hoc, el ROR añadió información importante para DRFS después de 5 años más allá y por encima de las variables clínicas estándar de todos los pacientes. El ROR (continuo y basado en grupos de riesgo) mostró una información de pronóstico similar en varios subgrupos. También se realizaron análisis limitados utilizando la RFS. Con las clases de ROR también se pudieron definir tres grupos de riesgo con distintas RFS. Para ambos estudios, hubo diferencias significativas entre la DRFS de los subgrupos luminal A y luminal B, independientemente del estado de los nodos.

**17 BIBLIOGRAFÍA**

1. Geiss, G., et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe sets. *Nature Biotechnology*, 2003; 26: 217-25.
2. Parker, J. S., et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(8): 1160-1167.
3. Dowsett, M., et al. on behalf of ATAC & 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*, 1 de agosto de 2013;31(22):2763-90.
4. Nielsen, T. O., 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.
5. Harris, J. R., et al. (Carcy, L., Perou, C.) *Diseases of the Breast*, 4ª edición. 2009:458-471.
6. Bahr, S. C., et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. *Nature Methods*, 2010; 7: 731-734.
7. Thoen, D. W., et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline, segunda edición. Clinical Laboratory Standards Institute, Volumen 24.
8. 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 Adjuvant, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. *Journal of Clinical Oncology* 2014; 20 de octubre, publicación en línea previa a la publicación en prensa JCO.2014.55.8894.
9. Cozzick, 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):135-41.
10. Ditsch, P. C., 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.
11. 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.
12. Cozzick, 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 Risk 21 Recurrence Score in Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2011; 29: 4273-4278.

*[Signature]*  
 Dra. SILVANA DANIELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 BIONTEC S.A.

*[Signature]*  
 Lic. Alejandro Díez  
 Asesorado  
 BioSystems S.A.

6293



- 13 (a) Jakesz, R., Jonat, W., Gnant, M., et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen. Combined results of ABCSG 6 trial B and ARNO 95 trial. *Lancet*, 2005; 366(9484): 455-482.
- (b) Jonat, W., Gnant, M., Boccard, F., Kaufmann, M., Rebagotti, A., Zuna, I., Greenwood, M., Jakesz, R.: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncology*, 2006; 7(12):991-996.
- (c) Gnant, M., Filipits, R., Grel, 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):338-45

19 DATOS DE CONTACTO

NanoString Technologies@, Inc.

Datos de contacto en los EE. UU.:

NanoString Technologies, Inc.  
530 Fairview Ave N, Suite 2000  
Seattle (Washington) 98109  
Teléfono: 888-358-NANO (888-358-6268) Fax: 206-378-6288

EC REP

Representante autorizado en la UE.

Emergo Europe  
Molenstraat 15  
2513 BH, La Haya  
Países Bajos  
Teléfono +31.70.345.8570

Titular del registro en Israel:

Emergo Israel  
Hashita St.19/1  
Yokneam Illit 20692  
Israel  
Teléfono: 077-5361147

Datos de contacto internacionales:

Correo electrónico del equipo de soporte técnico: [dxsupport@nanosttring.com](mailto:dxsupport@nanosttring.com)  
Correo electrónico de información de productos: [info@prosigna.com](mailto:info@prosigna.com)  
Sitio web: [www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)

18 SÍMBOLOS Y DEFINICIONES

- Fabricante

- Representante autorizado en la Comunidad Europea

- Dispositivo médico para diagnósticos *in vitro*

- Consulte las instrucciones de uso

- Marca CE

- Número de referencia o catálogo

- Código/número de lote

- Número de serie

- Contiene suficiente para <n> pruebas

- Condiciones de almacenamiento de intervalo de temperatura

- Límite inferior de condiciones de almacenamiento de temperatura

- Límite superior de condiciones de almacenamiento de temperatura

- Utilizar antes de fecha de caducidad

- Fecha de fabricación

Room Temp. = Temperatura ambiente

\*YB = Hibridación

Declaración de responsabilidad  
Para uso en diagnósticos *in vitro*.

©2012-2015 NanoString Technologies. Todos los derechos reservados. NanoString, el logotipo de NanoString Technologies, Prosigna y el logotipo de Prosigna son marcas comerciales registradas de NanoString Technologies.

Dra. SILVIA JANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.N. 421  
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez  
Aprobado  
BioSystems S.A.



**Prosigna**  
Cartridges

[www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)



**nanostriping**

[www.nanostriping.com](http://www.nanostriping.com)

6 2

**Prosigna**  
L'azienda leader  
in diagnostica  
CodeSet

[www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)

**Prosigna**  
L'azienda leader  
in diagnostica  
CodeSet

[www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)



**PROSIGNA**

[www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)

6 2 9 3

**V10 Tests**

**PROSIGNA KIT**

0100120214

2014-01

**30°C MINIMALE**

0100130314

30°C

30°C

**Prosigna**  
PREPAC  
Prep Pack

[www.prosigna.com](http://www.prosigna.com)

**prosigna**  
Prep Pack



MANOS STRING

PROSIGNA KIT  
(Lot) 0100120214

2012-07

V.40 Tests

PROSIGNA

0100120214

2012-07

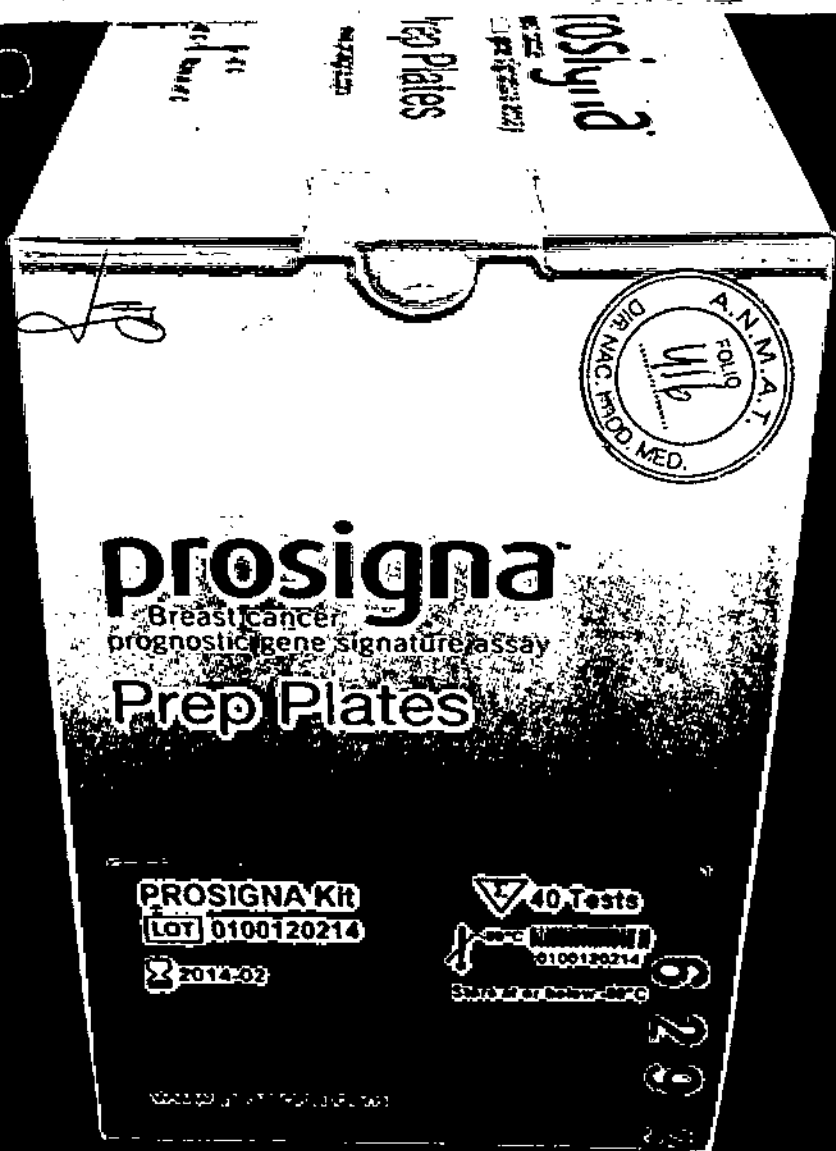
www.prosigna.com

2

9

**ManoString**

[www.manostring.com](http://www.manostring.com)



**prosigna**  
Breast cancer  
prognostic gene signature assay  
**Prep Plates**

**PROSIGNA Kit**  
Lot 0100120214  
2014-02

**40 Tests**  
Start at or below -80°C

6  
2  
9

© 2014 Abbott Molecular, Inc.



Ministerio de Salud  
 Secretaría de Políticas, Regulación  
 e Institutos  
 A.N. M. A.T

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE  
 PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO**

Expediente nº 1-47-3110-650/16-8

Se autoriza a la firma BIOSYSTEMS S.A. a Importar y comercializar los Productos para diagnóstico de uso in vitro denominados 1) SISTEMA DE ANÁLISIS nCounter® Dx/ SISTEMA CONFIGURADO ESPECIFICAMENTE PARA SU USO CON LOS KITS DE PRUEBAS nCounter®; 2) PROSIGNA BREAST CANCER PROGNOSTIC GENE SIGNATURE ASSAY/ ENSAYO QUE UTILIZA EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS ENCONTRADAS EN TEJIDO CON CÁNCER DE MAMA, FIJADO EN FORMALDEHÍDO Y EMBEBIDO EN PARAFINA (FFPE), PARA EVALUAR EL RIESGO DE RECURRENCIA A DISTANCIA EN UN PACIENTE.-----

**PRESENTACIÓN:** 1) CONFORMADO POR nCounter® PREP STATION 5S Y nCounter® DIGITAL ANALYZER 5S; 2) ENVASES POR 1, 2, 3, 4, 10, 20, 30 O 40 DETERMINACIONES, CONTENIEDO:

Nº de determinaciones	1	2	3	4	10	20	30	40	
A) 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	2 x 65 µl	3 x 65 µl	4 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	2 x 70 µl	3 x 70 µl	4 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	2 x 30 µl	3 x 30 µl	4 x 30 µl	
CodeSet Barcode Sticker	1	1	1	1	1	2	3	4	

*Handwritten signature and initials*

Test Configuration Code	1	1	1	1	1	2	3	4
B) Prosigna Prep Plate Box								
Prep plates	1	1	1	1	2	4	6	8
C) Prosigna Cartridge Box								
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1	2	3	4
D) Prosigna Prep Pack Box								
nCounter Prep Station	1	1	1	1	1	2	3	4
Tips								
nCounter Cartridge	2	2	2	2	2	4	6	8
Adhesive Cover								
nCounter Tip	2	2	2	2	2	4	6	8
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	2 x 580 µl	3 x 580 µl	4 x 580 µl
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4	8	12	16
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4	8	12	16

Vida útil: 1) No aplica; 2) 8 (OCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado: A) -20 °C, B) - 80 °C, C) entre 2 y 8 °C y D) entre 15 y 25 °C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley N° 16.463 y Resolución Ministerial N° 145/98. Lugar de elaboración: NANOSTRING TECHNOLOGIES, Inc. 530 Fairview Ave. N, Suite 2000, Seattle, WA 98109. (USA) . En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N.M.A.T.

VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS,  
ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado nº **008429**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA  
MEDICA

Buenos Aires, **15 JUN 2016**

Firma y sello

**Dr. ROBERTO LINARES**  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.

*[Handwritten marks]*