

11	16 מאפייני ביצועים
11	16.1 דיק אנלטוי והדרות
12	16.2 RNA וריגישוט / פלט
13	16.3 בדיקת הפרעות.
13	16.4 ביצועים קליניים.
25	17 ביבליוגרפיה
25	18 סמלים והגדרות
26	19 פרטיטים ליצירת קשר

1 שימוש מיועד / מטרה

בדיקות **Prosigna®** של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי היא בדיקת אבחון *In Vitro* (נרכשת מבקרה) אשר משתמשת בפרקופיל בטוי הגנים של תאם שנמצא ברקמת סרטן ש כדי להעיר את הסיכון להישנות מרוחקת של המחלת אצל מטופלים. הבדיקה מודדת את פופול בעטי הגנים באמצעות RNA שחו"ל מרקמת סרטן שדקובה בעט פורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE). נתוני ביוטי הגנים משוקלים יחד עם משתנים קליניים לקביעה לתת-סוג (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like) וכן לקביעה דירוג המצביע על ההסתברות להישנות מרוחקת של המחלת. הבדיקה מתבצעת במערכת **nCounter® Analysis System** שאובנה קומפקטיבית בדיקת הסרטן שדקובה בעט פורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) קומפקטיבית כוקם לכינמה נגעה בסרטן שדק פולשני.

בדיקות **Prosigna** של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי מייעדות למטופלים עם סיכון שרעבו רירית שדק או טיפול משמר בשילוב עם טיפול מקומי או אזרוי בהתקם לתקן הטיפולי, לפחות לפאדי.

- א. סיכון פרוגנוטטי להישנות לאו השנות מרוחקת תקף לעשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שדק בשלב I או II, ללא סרטן בקשריות למפה, עם גידולי קולטן הורמוני חיובי (HR+) המתאים לטיפול אנדוקריני משלימים (אדגל'ובט) בלבד, בעט שימוש בשילוב עם גורמים קליניים-פטלוגיים נוספים.
- ב. סיכון פרוגנוטטי להישנות לאו השנות מרוחקת תקף לעשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שדק בשלב II או III, עם סרטן בקשריות למפה חיובי (HR+) המתאים לטיפול אנדוקריני משלימים (אדגל'ובט) בלבד, בעט שימוש בשילוב עם גורמים קליניים-פטלוגיים נוספים.

2 סקירה קצרה של מערכת הבדיקה

מערכת **nCounter Analysis System** מוספקת מודדיות שירוט, מוגבות, של בטוי גנים באמצעות קריואט דיגיטליות של השפע החיסוי של שעתוק mRNA באמצעות השלבים הבאים: (1) הכלאה (היברידיזציה) של RNA לגלאים מדוחים ולגלאי לכידה פלאו-איסטנסיטים, (2) טיהור של תרכובות המתרה/גלאים באמצעות **nCounter Prep** (משטחי הנקה של **nCounter**) שמכילים ריאגטים (חומרם מגבר) הנוחים לуйיבוד שלאחר ה הכלאה וקיומו במוחסנית **nCounter** בחנתה הנקה של **nCounter**, ולבסוף (3) נזחוח של מוחסנית **nCounter** בכלי הניתוח הדיאטלי של **nCounter** כדי לספק (4) נזחוח של מוחסנית **nCounter** גמali ה כלאה גםם הgalii המדווח מכך רצפים ייחודיים של גלאי דב"א לאוצר הכלאה וטיהור של המתרה. את גלאי ה כלאה והgalii המדווחים של גלאי דב"א לאוצר הכלאה וטיהור של המתרה. בדיקת **Prosigna** מודדת בו-לשלב עם בקרות חיוביות ושילוחות ליצירת **nCounter**. בדיקת **CodeSet** מוגדרת בו-זמןית את רמות הביטוי של 50 גנים המשמשים לאלגוריתם הסיווג לתת-סוגים פנימיים², 8 גנים של תחזוקה שוטפת המשמשים לנורמליזציה ואותות, 6 בקרות חיוביות ו-8 בקרות שליליות בתגובה הכלאה בודדת, באמצעות גלאים של חומצת גרעין שתוכנו במיוחד עבור גנים אלה. בדיקת **Prosigna In Vitro** (במקרה) עבר כל אחד מ-58 הגנים. דגימת היחסום נבדקה עם כל אחת ממצאות דגימות RNA של המטופולות כדי לאשר את ההערכת ונרגמל אותן האות מכלן.

בדיקות **Prosigna** מתבצעת על-גב RNA שבודד מרקמת סרטן שדקובה בעט פורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE). פטולוג בוחן זכויות נושאת צבעה בהמטוקסילין ואודזין (H&E) ומזהה (ומסמן) את האזור הנגע הסרטן שדק פולשני לשילוב בבדיקה. בנוספ, הפטולוג מודד את שטח הפנים של הגידול, שלפי ייקבע מספר זכויות הנושא האל צבעות הדרשות לבדיקה, ואת תאיות הגידול כדי לוודא נוכחות של רקמת גידול בכמות מספקת עבור הבדיקה. טכני מימון מבצע חתכי אמצעי באזורי שעיל-גב זכויות הנושא האל צבעות בהתאם לביקורת. בשלב הבא, RNA המבוקד נבדק במערכת הצבעה-B&E-**nCounter Analysis System** מהركמה. כדי לספק תוצאות בדיקה, כולל ת-הסוג הפליני, מידת הסיכון להישנות RNA-המחלה (Risk of Recurrence - ROR) וקטגורית סיכון.

Prosigna®
Breast Cancer Assay



עלון המצורף לאירוע
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (בדיקות **Prosigna** של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי)

גרסה 03, נוצרה 09-2023

בדיקות 10-1 סigma

תנאי אחסון

מחסונית לדיקת Prosigna של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי	-20 ° C Store at -20° C or below
Codeset לדיקת Prosigna של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי	-80 ° C Store at -80° C or below
תבילה הנקה לדיקת Prosigna של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי	+15 ° C Store at +15° C
משטח הנקה לדיקת Prosigna של חתימה גנטית לסרטן שדקביות מודד פרוגנוטטי	+8 ° C Store at +4° C

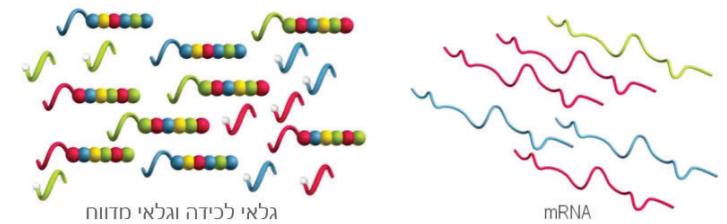
תוכן עניינים

1	1 استخدام מיועד / מטרה
1	2 סקירה קצרה של מערכת הבדיקה
2	2.1 עקרונות המבנה של nCounter Analysis System
2	2.2 עקרונות האלגוריתם של Prosigna לחישוב פלט
2	3 ריאגנטים וצידן מוסףים
2	3.1 סקירה כללית של נוכחת Prosigna עבור מערכת nCounter של Prosigna שדקביות מודד פרוגנוטטי
3	3.2 תוכן מערכת מודד פרוגנוטטי עבור מערכת nCounter של Prosigna שדקביות מודד פרוגנוטטי 4, 3, 2, 1, או 10 בדיקות.
4	4 אדרוראות ואצשי זהירות
5	5.1 עיבוד רקסומות
5	5.2 Prosigna של בדיקת nCounter
6	6 מידע בנושאי ה�建ה
7	7 טיפול בפסולת
8	8 אחסון וטיפול (ריאגטים).
9	9 המכשירים הדורשים לבדיקת PROSIGNA
10	10 ריאגנטים וצידן נדרשים, אך לא מוסףים
10.1	10.1 חומרם
10.2	10.2 צידן
10.3	10.3 מפרטן צידן
11	11 איסוף ועיבוד הדגימות
11.1	11.1 דרישות דגימות הרקמה וסקירה פתולוגית.
11.2	11.2 איסוף ו אחסון הדגימות
11.3	11.3 הנקה של זכויות הנושא.
11.4	11.4 עיבוד של זכויות הנושא.
11.5	11.5 בידוד RNA-h
11.6	11.6 מדידת הריכוז והאיכות של RNA-h
11.7	11.7 לילר הבדיקה
12	12 הוצאות הבדיקה וכתלים בבדיקה
13	13.1 ת-הסוגים נמיים
13.2	13.2 דירוג הסיכון להישנות המחלת (ROR).
13.3	13.3 הסתברות של הישנות מרוחקת במשך של 10 שנים.
13.4	13.4 סיווג הסיכון
13.5	13.5 בקרת איכות
14	14 מגבלות ההלכcisim
15.1	15.1 טווח ה-ROR- לפ-תת-סוג.
15.2	15.2 שכיחות של דירוג ROR לפ-מצב קשורות.
15.3	15.3 שיעור הירידות לאו הישנות מרוחקת לפ-סיווג סיכון.

2.1 עקרונות המערכת nCounter Analysis System

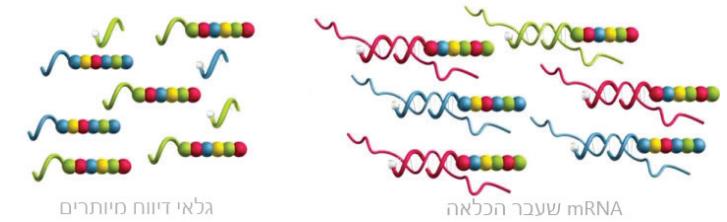
המערכת nCounter Analysis System מושתמת בצדדי mRNA-הטימה, ומבלטת תגנות אণומיות שלולות להטוט את התוצאות. בשלב הראשון של הבדיקה, אליו הדן'א נקשרים ישרות לאזור המedioן של 100–70 זוגות בסיסים, אשר משלים את מטרת mRNA-הטימה. הגלי הפלואורוצנטני המדוחן מכיל רף של 50–35 גלאים לשישה מקטעי RNA-הטימה באחד מאורבעת החבטים הפלואורוצנטיטיים: אדום (R), אדום (Y), צהוב (Y), צהוב (B), או יין (G). המקטעים הפלואורוצנטיטים יוצרים "קוד צבע" פלאורוצנטני בעל שישה חחול (B), או יין (G). גליידה נורדר מילר רף של 50–35 גלאים מיקומית/ארבעה בעקבם, שהוא ייחודי לכל טירה. אליא לידייד נורדר מילר רף של 50–35 גלאים בסיסים, אשר משלים את מטרת mRNA וביוטין, המשמש לקיבוע בדוכית ביציפי סטרפטוידיין (Streptavidin).

איור 1: הצלאת Codeset mRNA

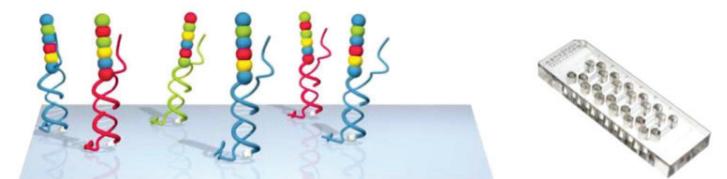


לאחר הצלאה, כל שלבי הטיהור של הדגימה מותבצעים באופן אוטומטי בתחנת ההכנה של nCounter. תחילה, מותבצעה הסרה של גלאים מזוחים וגלאי לכידה מיטרים (איור 2). באמצעות שלבי לכידה של חזרזים מגנטיים ריצפים וקשרת קומפלקסים גלאי-מטרה למיקומים אקראים על גבי משטח המחסנת nCounter דרך קשירת סטרפטוידיין-ביוטין (איור 3). לבסוף, הקומפלקסים גלאי/מטרה מושגים ונקובעים (איור 4) במחסנת nCounter.

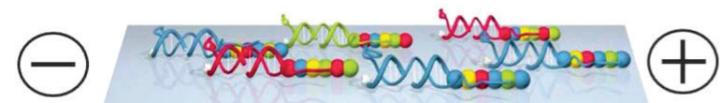
איור 2: הסרה של גלאים מזוחים מיטרים



איור 3: קישור גלאים מזוחים שעברו הכלאה למשטח המחסנת



איור 4: יישור וקיון של גלאים מזוחים שעברו הכלאה



לאחר סיום הטיפול בדגימה, מניחים את המחסנית בכל הניתוך הדיגיטלי של nCounter לאיסוף נתונים. כל מולקולת מטירה שיש בה עניין מזוהה על-ידי "קוד הצבע" שנוצר על-ידי ישנה "כתמים" (spots) פלאורוצנטיטים הנמצאים על הגלי המedioן המשוין אליה. לאחר מכן סופרים את הגלאים המדוחנים על משטח המחסנת, ערכים אותם בטבלאות עברור כל מולקולת מטירה ומעדדים אותן עם האלגוריתם (איור 5).

איור 5: איסוף נתונים

ספירה	גנ	קוד
3	x	██████
1	y	█████
2	z	████

2.2 עקרונות האלגוריתם של Prosigna לחישוב פלט

הבדיקה מבוססת על האלגוריתם המדוחן לסיווג 50 גנים, המכונה במקור PAM50², והוא מבוצעת במערכת Counter Analysis System (FFPE). האלגוריתם משתמש במרקם סרין שדקובע בפורמלין ושמורו בתוך פרפין. המרקם שומר את סרין השד לאחת ארבע קבוצות מולקולריות, או תתי-סוגים פונמיים: Basal-like, Luminal A, Luminal B, HER2-enriched; או תתי-סוגים פונמיים לביטוי גנים (לדוגמה, צנורואיד) של ארבעת התתי-סוגים הפונמיים נשמרו במערכת Counter Analysis System לביטוי גנים מרוביים שדקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) שנאפסו מאטרים קליניים מרוביים בוצען אמריקאי. לאחר ביצוע הבדיקה על דגימה לבדיקה של מטופלת, אלגוריתם חישובי המבוסס על תווים פירסן משווה את פרופיל הביטוי המנורמל של 50 גנים של אותה דגימה לבדיקה של המטופלת, לפופולרי הביטוי הא-טיפוסיים של ארבעת התתי-סוגים הפונמיים של סרין השד. הדגימה לבדיקה של המטופלת מושיכת לתת-הסוג בעל מתאם פירסן הגבוה ביותר.

לאחר מכון מדוחן האלגוריתם על מידת הסיכון להישנות המחללה (ROR) בסולם של 0–100³, שיש מתאם בין הרסתורבות להישנות מוחקה בשווה של עשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרין שדקובע עם גידולי קוולון הוורמן חיובי (HR+).⁴ מידת הסיכון להישנות המחללה (ROR) מחושבת בעדotta מינדרמים ממודול קווקס הכלול בתת-קובץ בת-46 גנים מתוך 50 הגנים לכל צנורואיד של תתי-סוג נרוי, שעור התරבות גודל גידול כלל. מכפילים את משתני הבדיקה במקדים המתאימים של מודול קווקס כדי ליצור ציאן, המותאמת לאחר מכון לsolomon 100–100 המבוסס על מקדים שנוצרו מנוכת הלימוד של דגימות סרין החדש שדקובעו בפורמלין ושמרו בתוך פרפין (FFPE). בנוסף, קטגוריות סיכון מדוחחות בהתבסס על ערך סף (Cut-off) של ROR שנקבעים ממחקר אינומת קליני.

3 ריאגנטים וציוד מסופקים

3.1 סקירה כללית של מערכת Prosigna

מערכת Prosigna מכילה ריאגנטים במספר המאפשר עבודה של 1, 2, 3, 4 או 10 דגימות של מטופלות, בהתאם למועד שהזמנן. לקבלת פרי הזמנה עין למיטה. מערכת Prosigna מכילה CodeSet, מבנהו עם דגםית ייחוס לכל מערכת המכיל 1-10 בדיקות, ורכיבים מתכליים, הנגדים ייחד לבדיקת ביוטים לפני המשולח.

מספר קטלוגי	מספר בדיקות בדרכו	מבחן דגימות ייחוס כוללות
2	1	PROSIGNA-001
2	2	PROSIGNA-002
2	3	PROSIGNA-003
2	4	PROSIGNA-004
2	10	PROSIGNA-010

מומלץ לשימוש בשילוב עם מערכת מיצוי Veracyte FFPE RNA (550100). מערכת מיצוי זו דמינה רק דרך Veracyte.

3.2 תוכן ערכת Prosigna עבור ערכת Prosigna של 4, 3, 2, 1 או 10 בדיקות

מספר בדיקות						קופסת Prosigna CodeSet
10	4	3	2	1		
1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	CodeSet	Diagnos Prosigna
1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	ProbeSet	Diagnos Prosigna
1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	Prosigna RNA-ל-ט'	Diagnos RNA-ל-ט'
1	1	1	1	1	CodeSet	Diagnos RNA-ל-ט'
1	1	1	1	1	CodeSet	Diagnos RNA-ל-ט'
קופסת צלחת הנקה של Prosigna						קופסת צלחת הנקה של Prosigna
2	1	1	1	1	1	צלחות הנקה
קופסת מחסניות של Prosigna						קופסת מחסניות של Prosigna
1	1	1	1	1	nCounter	מחסניות
קופסת חיילת הנקה של Prosigna						קופסת חיילת הנקה של Prosigna
1	1	1	1	1	nCounter	חיילות תחנת הנקה
2	2	2	2	2	nCounter	פיזי דבק מחסנית
2	2	2	2	2	nCounter	טפי מדן
1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	nCounter	מאג'ר הכלאה
4	4	4	4	4	nCounter	כיפורת רצשות מחורצים היבש
4	4	4	4	4	nCounter	מכי צינור רצשות 12 רצשות מחורצים היבש

תיקון תיאור

Prosigna CodeSet

חסץ, חומצות גרעין עם צבעים ניאון	ט קודים של Reporter Prosigna
חסץ, חומצות גרעין	Prosigna Capture ProbeSet
חסץ, חומצות גרעין	Diagnos התאייות-ל-ט'
גילוין מדקבקה	CodeSet בדיקות בדיקות של 4, 3, 2, 1 או 10 בדיקות
כרטיס עם מדקבקה	בדיקת קוד וצורה

צלחות הנקה של Prosigna

צלחות הנקה	צלחות הנקה
חזרזום סופר-מגנטיים, חוץ, מלחים,	ט קודים של Reporter Prosigna
אולימוקלאוטדים, חזרז פוליסיטין המכילים	Prosigna Capture ProbeSet
צבעים ניאון	Diagnos התאייות-ל-ט'

מחסניות Prosigna

מחסניות	nCounter
מחסניות לדוגמא	מחסניות

חיילת הנקה של Prosigna

חץ, מלחים	ט Counter
רצשות פלסטיק	12 צינורות רצשות מחורצים היבש
מכס פלסטיק	מכס צינור רצעה עם 12 רצשות מחורצים היבש
2 מתלים של 90 טיפים 6 פירסרים	nCounter
סרטי דבק	ט Counter
מחזקי קצה 6 בארים	ט Counter

4 אזהרות ואמצעי זיהירות

- שימוש באבחון *In Vitro* (במעבדה).
- בדיקה זו נעודה להציג על-ידי מפעליים אשר עברו הכשרה בטכניות מורכבות במיוחד של ביולוגית מולקולרית, בהתבסס על תקנות מקומות.
- אין לערבות בין רכיבי ערכות במנות (lot) שונות של Prosigna אריך וرك, ובמנות שנקבעו במהלך היצור.
- פעולות תקינה של ערכות Prosigna אריך וرك בשאריות ריאגנטים בבדיקה של Prosigna.
- אין לשמש שימוש חוזר בשאריות ריאגנטים בבדיקה של Prosigna.
- השלך את כל התגובהות שלולות לשאת פוטנציאל לסיכון מחייב זמני הכלאה או טמפרטורות הכלאה.
- חווב לשומר על שלמות שרשת הדגימה (רकמה ל-RNA ו-RNA ל-ט') כדי להבטיח שមזהה הדגימה של המטפלת משיק לתוצאות הבדיקה הנכונה.
- אחסון שאגי של ריאגנטים, שלא על פי התנאים המופיעים על גב התווית, עלול לגרום בריצועי הבדיקה.
- בזמן הטיפול בערכות דזוכיות, ואת האטול (EtOH) ואת תוקן כיל הצבעה השני של ד-לימונן (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-8-ערכות ד-לימונן (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-4-ערכות דזוכיות, ולשיטות בסביבה יבשה.
- הימנע מזיהום RNase, או שער עלול להשפיע באופן שלילי על איכות התוצאות.
- יש לטפל בכל הדגימות והחומרם הביוווגים תוך ידיעה שהם עלולים להוות סיכון להعبدת חומרים מהרמים, ולהשליך אותם על פי אמצעי הזיהירות העומדים בתקנות הפלדיות, המדיניות והמקומיות.
- הקפד לא להשתמש בפופטה בעזרת הפה.

- הימנע מגעה של ריאגנטים עם עיניים, עור ומברשות ריריות.
- השתמש בשיטות בעודה מומלצות של מעבדות מולקולריות כדי למנוע זיהום תוך מעבדתי בין דגימות הבדיקה או עם מטרות חומצות גרעין ביריכו (סינטטי או אמפליפיקציה של PCR) שעולות להשפיע באופן שלילי על איכות התוצאות.
- לאחר התהילה, משתחי הנקה לבדיקת Prosigna ומחסניות Counter.
- עשויים לכלול רמות נמוכות מאוד של אزيد הנתרן (> 0.1%), אך מומלץ להשתמש בכל קליקי פלסטיק (ולא מכתף) כדי להשליכם. על אף שהסבירות לכך בדיקת Counter Analysis System נמוכה מאוד, ידוע כי הצבירות של אزيد הנתרן על מנת עלולה לגרום לפיצוץ מזוקן.
- ניתן למזואה פרטיטים נוספים לגביו השלכה של מכשירים ספציפיים במדריך לשימושם של Counter Analysis System (Counter) ובסדרי השירות של חומרה (MSDS) עבור נזק כוונוני.
- ניתן למצוא גילוין הבלתי מדויק (לידיה, בפור הכלאה ומשטוח) הנקה בכנותה הדגימת הנקה את כל החומרים המסוכנים בהתאם להנחיות הארגון שלך בנושא השאלת חומרים מסוכנים.
- יש להシリיר כל CodeSet שלא נעשה בו שימוש.
- אם קטגורית גודל הגידול של השפיע באופן שלילי על דירוג מידת הסיכון להישנות המחללה הדבר עלול להיות כתוצאה מזיהום הסיכון (ROR) ועל סיווג שגוי.
- אם מצב הקשרויות של המטפלת אינם מוחזק בהתאם לדוחה, דירוג שגוי.
- הבדיקה של המטפלת עלול להיות שגוי (לדוגמא, סיווג סיכון שגוי).
- אין להשתמש ב-RNA בעל איכות ירודה או כמוות נמוכה או בדגימות גידול בעלות עליונות פנימית פגיעה קרטון Prosigna לא תקין לא תאפשר תפקה ובמקום זאת, תקבל דיווח על כישלון הבדיקה.

5.1 עיבוד רקמות

- הבדיקה נעודה לשימוש דגימות של רקמת סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפן (FFPE), אשר הוסכו בינו לבין בלבד. היא לא נעודה לשימוש במרקמת סרטן אחרת או במרקמת סרטן שמיון.
- הגדול הכלול של הגידול הראשון של מטפלת כהלה מוצב הנקה בדיקות מדרישים לביצוע הבדיקה.
- השתמש בקצחות חד-פュמיים (טיפים) ווטרילים למיקרו-פיפטוט כדי להימנע מזיהום חידקי וגרעיני של ריאגנטים או דגימות במהלך העבודה.
- שמור את דגימות ה-RNA המבוקד על קרח רטוב כאשר לא מוצעים עליון מניפולציה באופן פעיל.
- תרומות מומלצות מכך דרישים לבקלים של חימום.
- אין להשתמש ברכבי ערכה אם הם פגומים.
- מומלץ שמעבודת Prosigna יפותחו בקרם קלינים (לדוגמא, לקטגוריות סיכון) ושיטשו בהם כדי להבטיח את דיוק התוצאות לאורך זמן כחlik מנהלי בקרת אינטלקט טכנולוגית של מעבדות.

5 שיקולים כלליים בבדיקה

- חויר יכול להסיק בהצלחה רקמה סמוכה שאינה רקמת גידול/ракמה וביליה באמצעות מאקרו-דיסקציה במהלה הטיפול במרקמת גידול/ракמה וביליה. חסר של הסיכון עקב דירוג ROR נמוך יותר מאשר המדויקו.
- חויר יכול להסיק בהצלחה דלא' גנומי אונשי במהלך הבדיקה נמוך יותר, או הבדיקה יתירה להוביל לשיעור ישולן גבוה יותר עקב אות בדיקה נמוך יותר, או הבדיקה יתירה של סיכון עקב דירוג ROR גבוהה עקב אות בדיקה נמוך.
- יש להזכיר את כל קטעי הרקמה הלא צבועה על גב צובאות נושא למיקרוסקופ, בעלות מטען חיזובי, כדי למנוע פירודות במהלך הבדיקה.
- בדגימות הדורשות צובאות נושא מרבבות, יש לטפל בכל ה指挥יות יחיד.
- קטיע רקמה הממנחים על צובאות נושא מרבבות, אם תפרק אם תחcen אוטם למשר יותר מ-9-חוודשים בסביבה יבשה.
- החלף 3% מותמיסט השימוש בגליצרול מדן שבוע, או אם התמיסת הופכת להיות שקרה, כדי למנוע זיהום.
- החלף את תוקן השטיפה הריאנונה של ד-לימונן (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-4-ערכות דזוכיות, ואת האטול (EtOH) ולאחר הטיפול ב-8-ערכות ד-לימונן (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-4-ערכות דזוכיות, ואת האטול (EtOH) ואת תוקן כיל הצבעה השני של ד-לימונן (D-Limonene) על מנת לאפשר דזוכיות בסביבה יבשה.
- נקוט זהירות במהלך המהלך ימונן אזור הגידול על גבי ה指挥יות הנושאת שלא צבעה ובמהלן הסרת הרקמה שנייה רקמת גידול, כדי לוודא שrankת הגידול אינה מופרעת.
- טפל בזרירות בחפצים חדים במהלך המקרו-דיסקציה.

10 ריאגנטים וצירוד נדרשים, אך לא מסופקים

10.1 חומרים

- ערכת בידוד RNA שקובעה בפורמלין ונשמרה בתור פרפין (FFPE) (ע"י בסעיף 11.5 לדרישות ערכת הבידוד אם אין מושתמש בערכת מיצוי RNA של Veracyte FFPE שנרכשה דרך Veracyte).

2. המטוקסילין ואודזין (H&E).

3. זכויות נשוא למיקרוסקופ, בעלות מטען חיובי.

4. חומר ניקוי דילימון (D-Limonene) (דרוג היסטולוגי).

5. 100% אטנול (אבסולוטי), דירוג ACS או שווה-ערך (לא פחות מ-99.5%).

6. גליצרול, דירוג ביולוגיה מולקולרית.

7. מים ללא נוקלאז, דירוג ביולוגיה מולקולרית*.

8. 100% איזופורונול*.

9. צינור חרוטי 50ml.

10. ככini גלוחן (או ככini חיתוך (סקלפל) חד-פעמיים).

11. להבי מיקרוטום חד-פעמיים.

12. מבנה של 1.5 או 1.7 מ"ל מיקרו צנטריפוגה ללא RNase עם ציפוי Nonstick.

13. קצוזות חד-פעמיים (טיפים) למיקרו-פיטות ללא RNase עם מחסום בפני אירוסול.

10.2 ציון

1. מיקרוטום
 2. אמבט מים (40°C)
 3. מתן חימום לצטוכיות נושאות (45°C)
 4. תבנית יבש לצטוכיות נושאות למיקרוסקופ
 5. מיקרו-פיטות; 2 mL, 20 mL, 1000 mL ו- 1 mL
 6. מינ-צנטריפוגה עם רotor ל מבחנה ברכזעה של 0.2 mL ו rotor סטנדרטי
 7. מבחרת מיקרו-צנטריפוגה של 1.5/2.0 mL
 8. מיקרו-צנטריפוגה שולחני סטנדרטי עם רotor בהזיה קבוצה המתאים ל מבחנות צנטריפוגה של 1.5 mL
 9. כל צבעה מלבייני עשויים זכוכית, עם מסכים (מידות פנימיות משוערות 3.6 mm × 2.4 mm × 91 mm) ; היקומות הנדרשת - 3
 10. מבנית זכוכית (יכולה להכיל עד עשר זכוכיות נשא בגודל 1" × 3" × 75 mm)
 11. בлок חום בס, חום יבש*
 12. ורטקון שלולני ל מבחנות מיקרו-צנטריפוגה
 13. צילידן מדידה (גודל מומלץ: 100-250 mL)
 14. מחת מתן או יינטלה לאזכוכית מכוסה (מכופפת, לא משוננת)
 15. ררמנטורם מילרים (מסכים טוח של 80°C עד 55°C Vis/UV) (ראה מפרטים להלן)
 16. בлок חום עם מסכת מחומרם (ראה מפרטים להלן)
 17. צנטריפוגה עם מתאם מיקרו פלטה (ראה מפרטים להלן)
 18. מיל עגול לצביעת זכוכית נשא Coplin

*צידן הנדרש לפחות RNA עם ררכת מיושן RNA של Veracyte FFPE RNA.

10.3 מפרטן ציוד

טבלה 1: ספקטראופוטומטר למיקרו-וילוום Vis/VIS לניתוח כמות של חומצת גרעין, ספקטרים מלא

מפרטים	מרכיב עיצוב
1-2 μm	טווח הייקף הדגימה
1 מ"מ	אורך נתיב
nm 280-260	טווח אורך גל
± 0.001	דיזין או שגיאה של אורך גל
4 קוטן-מח 4 או שווה ל-מח 0.003 (נתיב 1 מ"מ)	רזולוציה או רוחב פס של מכשיר מדידה ספקטרלי
5 ng/ μL RNA	דיזין של יכולת ספיגה או שגיאה פוטומטרית
> 1000 ng/ μL RNA	אקריאת
	מוגלה של דיזין
	רכיבי מרבי

טבלה 2: ספקטרופוטומטר למיקו-ויליאם פוטודיזה Vis-UV לניטוח כמות של חומצת גרעין

מרכיב עיצוב	מפורטים
טווו היקף הדגימה	1-2 μm
אזור נתיב גל	0.5 μm
טווו אורך גל	280 nm - 260 nm
ריזויזה של מכשיר מדידה ספקטרלי	קוטן מ-8nm ועד שווה ל-מח 8
דיזון של יכולת פסיג	(260 nm - ב- 1.05 Abs (3%)
מגבלה של זהיר	4 ng/ μ L RNA
ריכוז מרבי	> 1000 ng/ μ L RNA

10. השתמש בסכין חדשה עבור כל דגימת רקמה שאתה מטפל בה.

11. יש לבדוק מנת/אצאות חדשות של שעוכות בדוד RNA לנגד הסופו-יפיציות (מרטיטים) של מערכת הבידוד כדי להציג את מנתה הערכה החדשות לבדיקה מטפלות (ראה סעיף 11.5 ל痼לת פרטיטם).

5.2 ביצוע הבדיקה של Prosigna

1. הפקד להזין כהלה בתוכנה את גודל הגידול הראשוני הכלול הקטgoriy של המטופלת.
 2. הפקד להזין כהלה בתוכנה את מצב הקשרות הקטgoriy של המטופלת.
 3. ווא שבלוק החימום עם המכסה המוחומם, המדרש לצורר ההכלאה, עמד בדרישות ומוכן באפון סדייר.
 4. השתמש ארך וرك בחומרים המתכליים שצורפו לערצת Prosigna Counter. הם נועד לפועל ספציפית עם תחנת ההכנה Counter n. וכל הניתוח הדיגיטלי של Counter.n.
 5. אם בופר הכלכלה אוחסן בטמפרטורת קרות ונכפה משקע, חמא את המבחןות בטמפרטורה של 37°C עד להמתת המחלים.
 6. אין לערבל בורטקס את ריבבי הביקקה כדי לערבע, מאחר שהזען יכול לפגוע בראגטים. הערבוב צריך להתבצע בעורצת פיטחה.
 7. אין להפריד בצנוריפוגה את CodeSet גלאי הדוחות במחירות גבואה $\text{m-9} \times 3,000$ למשך 10 דקות. אין להשתמש באפשרות "pulse" (פוליטים) כדי להפריד בצנוריפוגה. אפרשות זו עלולה לגרום את CodeSet של אונס את תוצאות הבדיקה בטמפרטורה של 65°C עד שאלו מוכנות להערכה לתחנת ההכנה. הגדרת בלוק החימום לירידה של עד 4°C או הנחת הדגימות, Cross-hybridization בקורס הבדיקה עלולה לגרום לתוצאות הבדיקה.
 8. אם לא תנית את המבחןות בטמפרטורה של 15 65°C דקומות מרוגע הוסיפה ProbeSet גלאי הליידיה, והדבר עלול לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר בתורה עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
 9. אם לא תחיל בעיבוד תחנת ההכנה 15 דקומות מרוגע הוצאת הדגימות בטמפרטורה של 65°C , הדבר עלול לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר בתורה עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
 10. אם לא תחיל בעיבוד תחנת ההכנה 15 דקומות מרוגע הוצאת הדגימות בטמפרטורה של 65°C , הדבר עלול לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
 11. ווא שהמרכיבים של המבנהות אוטומים הטע ליפוי ההכלאה בבלוק החימום כדי למנוע התאיידות אשר עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.

6 **מידע בפושא הקשרה**

בדיקה זו נועדה להתבצע על ידי מפעליים מקצועיים אשר עברו הכשרה בטכניוקס Veracyte, מוכרכות במיוחד בזיהוגה מולקולרי, בהתקשרות על תכונות מזקומיות. פנה ל-Propositi לפרק זה שורש הבדיקה ספציפית ליריעות הרדיקלה של חומרים.

7 טיפול בפסולת

עין במדרך למשתמש של המערכת Counter Analysis System (CAS) לקבלת מידע אודוט טיפול בפסולת, שהנו ספציאלי לריגנטים ולמכשורים שנעשה בהם שימוש ביישומי IVD.

עין בערכת מיצוי-hRNA שבחורה הוראות לשימוש לטיפול בפסולת ופרטים ספציפיים לריאווחות לחסין RNA.

8 אחסון וטיפול (רייגנטים)

תאריך התפוגה של כל רכיבי ערכת הבדיקה מופיע בתווית הברקודה המצורפת למאראט. **CodeSet**. וכן לתווית החזאותית המושיפה על גבי הפארטים של כל רכיבי **Span**.

- יש לאחון את רכיבי המארז CodeSet של Prosigna (CodeSet לגלאי ProbeSetProsigna) מודיעו של RNA לגדילן נסיעה של 80°C- ומטה.
 - יש לאחון את רכיבי המארז nCounter Cartridges (mRNA נסיעות nCounter) בטמפרטורה של 20°C- ומטה.
 - יש לאחון את רכיבי Prep Plates nCounter (משטחי הכנה של Counter n) בטמפרטורה של 4°C (2-8°C).
 - יש לאחון את רכיבי תבנית nCounter Prep Plates (משטחי הכנה של Counter n) בטמפרטורת החדר, בין 25°C-15°C.

9 PROSIGNA לבדיקת הדרישים המכשירים

- מתקנה מדידה וניתוח (nCounter Analysis System) מתקנה הכנה (nCounter Prep Station 5s) מתקנה דיגיטלי (nCounter Digital Analyzer 5s) מתקנה ניתוח דיגיטלי (nCounter ANALYZER) סדרת nCounter Analysis System

11.2 איסוף ואחסון הדגימות

1. ניתן לבצע את הפעולה המומתגרת להלן בהתאם למועד הפעולה הרגלי של המעבדה: איסוף הרקמה וקיומה בפורמיין, טיפול בבלוק הגידול שקובע בפורמיין ונשמר בתוך פרפין (FFPE) ואחסונו, והבררת רקמת-ה FFPE על גבי זכוכית נשאת.
2. יש לאחסן את קטעי הרקמה שקובעה בפורמיין ונשמר בתוך פרפין (FFPE) שעלה-גביו זכוכית בהתאם להלן הפעולה הרגליים של המעבדה. כאשר מדובר באחסון לפרק זמן אין ארכויים יותר (< 30 ימים), יש לאחסן את זכוכית הנושא בסביבה יבשה ולעבד אותה תוך פרק זמן של עד 9 חודשים כדי להבטיח את איכות תוצאות הבדיקה.

11.3 הכנה של זכוכיות הנושא

1. באמצעות מיקרוטום, יש לחזור קטע עבה בגודל 5-4 ס"מ לצביעת ה-E&H.
2. באמצעות מיקרוטום, חזור קטעים עבים של ס"מ 10 לשימוש בבדיקה של Prosigna.
3. הצל את הקטעים באמצעות מילימטרורא של 40°C.
4. הנה את הקטעים על גבי זכוכית נשא למירוסקופ בעלות מטען חיובי.
5. הנה לזכוכית להתייבש.
6. הנה את הזכוכית לתנור למשך הלילה בטמפרטורה של 45°C.

11.4 עיבוד של זכוכיות הנושא

1. herein תמייסת עבורה המכילה גיצרול בריכוז 3% על-ידי ערבות 1.5 מ"ל גיצרול עם 48.5 מ"ל מים ללא נקלואז בירוג מולקולרי; דרג לפ' מידת הבלתיווניות. מזווג את התמייסה למיליל Coplin וטיפול בזכוכיות הנושא.
 2. מזווג כמות של כ-200 עד 250 מ"ל של חומר נקי D-Limonene לשיני מיליל צבעה, ועדן זכוכיות הנושא טבולות באופן לא-לאבתנית לאחסון הזכוכיות.
 3. מזווג כמות של כ-200–250 מ"ל אל-אתיל אבсолוטי (EtOH) למיליל צבעה שליש.
 4. הנה את קטעי הרקמות הלא צבועות שעיל-גביה זכוכיות בתבנית לאחסון זכוכיות נשאות.
 5. הנה את התבנית זכוכיות הנושא במיליל הצבעה הראשון של ה-E&H ונער אותה בעדינות לפנים ולאחר מכן למשך 10 עד 15 דקות. השאר את התבנית במיליל הצבעה הראשון של D-Limonene-2 דקות.
 6. העבר את התבנית ממיליל הצבעה הראשון של D-Limonene-2 למיליל השני של ה-E&H. נער בעדינות את התבנית במיליל הצבעה השני של ה-E&H לאחר 10 עד 15 דקות. השאר את התבנית במיליל הצבעה השני כל הפרפין; אחרת, השאר את התבנית במיליל הצבעה השני של D-Limonene-2 למשך 2 דקות.
 7. העבר את התבנית ממיליל הצבעה השני של D-Limonene-2 לשיטיפת EtOH. נער בעדינות את התבנית לפנים ולאחר מכן למשך 10-15 דקות והוא אotta לאחר 2 דקות.
 8. הנה לזכוכיות הנושא להתייבש למשך 5-10 דקות או עד ליבוש מלא, והרקמה תציג לבן (הפעולה עשויה להימשך זמן רב יותר, תלוי בוגדי הרקמה).
 9. סמן את איזור הרקמה על החלק האחורי של זכוכיות הלא צבועות על-ידי יישורו כנגד זכוכיות הצבעה של ה-E&H בתאתמה, וטרנספוציה של האזורי המסתובן.
 10. בצע רה-הידרציה של הרקמה, זכוכיות אחת בכל פעם, בזכוכית המסומנת הלא צבועה על-ידי טבילה הזכוכית בתמיסת גאלציטול 3%.
 11. הסר את גאלציטול המיותר מהזכוכית עם קקמה מהmundra.
 12. בזמן עיבוד של זכוכיות מורות, המשמש יכול לאפשר לזכוכיות להתייבש על מעמד יבש במלר רה-הידרציה של זכוכיות האחרות.
 13. הסר באמבטונות סכין גלווח או סכין סקלפל כל קקמה שנייה רקמת גידול מסביב לאיזור הגידול המסתובן, והשליך אותה.
 14. תוך החזקה קצה אחד של זכוכיות והונחת הקצה الآخر שלא על משטח יציב בזווית של 45 מעלות, אוסף את רקמת הגידול ששביעת בה מאקרו-דיסקציה לקצתה של סכין הגלוח. הרקמה אמרורה "ליהסתלול" בקהלות על גבי סכין הגלוח בזמן האיסוף שלו.
 15. חזרו על השלב הקודם עבור כל זכוכית אותה דגימה.
- הערה:** ניתן לאסוף כמה זכוכיות לא צבועות, השיקות לאוותה דגימת FFPE, ואוותן סכין גלווח.
16. הblk בעדינות את קטעי הרקמה מאותה דגימה למכנת מיקרו-מרכזריפוגה מסווגת של 1.5 מ"ל.
 17. בימדה והש망ת בהן, שטוף את מחת המתקן או הפינצטה על-ידי טבילתן ב-D-Limonene-2 למשך כמה שניות ויובשן ב-1 דגימות הרקמה.

טבלה 3: בлок חיים עם מכסה מחומר להכללה של הבדיקה

מרכיב יצוב	מפורט
עיצוב של בлок החימום	<ul style="list-style-type: none"> ד Diskette התאמת לפרופיל הרגלי, מכונות מסווגות (keyed) ברכוצה. בלוק חימום המיפויים (מכונים גם בלוקים פרופיל בובה) "MRIים" לתוכסיקוליזיה (MRI). בלוק חימום המיפויים לסוגים אחרים של מכונות (לדוגמה, מבנות 0.1 מ"ל, מבנות 1.5 מ"ל) אינם מתאימים מברשות עמידה בטמפרטורת 65°C ± 1°C ± מתח C 65°C. דרשת אשורת מכונות בעמידה בטמפרטורת של 65°C ± מתח C 65°C. נית להשתמש במכונים בעלי גובה קבוע או מתכוונן 70°C. נדרש תכונת של המכונה ל-70°C.
עיצוב של המכונה המוחומת	

טבלה 4: מטריפוגה עם נשא מיקוח פלטה לסיבוב nCounter Prep Plates (nCounter מכנה של הבדיקה)

מרכיב יצוב	מפורט
מחיירות סרכוז	מינימום 9 x 2000
רוטרים	4 רוטרים מסווגים × 750 מ"ל עם מחזק' פלטה (או מקבילה אחרית) כדי להתאים לפולוטן בעלות 96 שקעים בתבנית SBS
מצבים	מצבי אצץ/האטא

11 איסוף ועיבוד הדגימות

11.1 דרישות דגימות הרקמה וסקירה פתולוגית

יש לבצע את בדיקת אחסון Prosigna של חתימה גונמית לסרטן שד לקיבוע מדד פרוגנוטי בדגימה של רקמת סרטן שד בעל גיזולי קלולן הורמוני חיובי שקובעה בפורמיין ונשמר בתוך פרפין (FFPE), המਸוגות על-ידי פתולוג証 קרמונה נגועה בסרטן שד פולני השיכת לאחד הסוגים הבאים:

- א. קריצינומה דוקטילית פולשנית
- ב. קריצינומה לובולרית פולשנית
- ג. קריצינומה פולשנית עם מאפיינים דוקטליים ולובולריים ("קריצינומה שערבת")

ד. NST (סוג שאינו ספציפי) או NOS (סוג לא מובהן). לצורך הבדיקה, על הפטולוג לבחור את בולוק הגידול שקובע בפורמיין ונשמר בתוך פרפין (FFPE) הכולל את האזור הגדול ביותר של סרטן שד פולני חי (viable).

הבדיקה דורשת קטע רקמה על-ידי זכוכית לא-צבעה לעירוב, זכוכית מקבילה (FFPE). צבעה ב-E&H מבלוק הגידול שקובע בפורמיין ונשמר בתוך פרפין (FFPE). מומלץ שחויתו קטע רקמה על-ידי זכוכית לא-צבעה לעירוב, זכוכית מקבילה (FFPE).

קטע רקמה הנחדר לצביעה ב-E&H כדי להבטיח שאזור הגידול המוחום בזכוכית הצבעה ב-E&H מייצג את איזור הגידול בזכוכית שאון בזענות.

על הפטולוג לסייע בזיהוי את איזור הגידול בזכוכית הצבעה ב-E&H, למעט הרקמה הסומוכה שאינה סרטנית.

הפטולוג או טכני מעבדה מזמין בזיהוי את תאיות הגידול ואת איזור השחטים הפנים של גידול בתוך האזור המסומן בעיגול של זכוכית הצבעה ב-E&H.

א. אחוז תאיות הגידול בזכוכית הצבעה ב-E&H חייב להיות ≤ 10%

ב. איזור שטח הפנים של הגידול, המסומן בעיגול, בזכוכית הצבעה ב-E&H חייב להיות 4 ± מ"ק

*שים לב שאיזור הגידול מתייחס לאיזור הגידול החפים בתוך

אזור הגידול המסומן בעיגול.

לזהנת קלט בבדיקה הבאה המכונה את מספר דיאג'ו זכוכית הנושא המומלץ בהתקבב על איזור שטח הפנים הנמדד על הגידול כולל גידול בלתי-

asm, בתהיל רדר-בדיקת הרקמה, תיגלה כי בולוק הגידול כולל גידול בלתי- מספק או תאיות בלתי מספקת של הגידול, ניתן לבצע הערקה של בולוק אחר הלוקו מזאות גידול. אם לא-קיימים בלוקים של פרפין (FFPE) המכילים רקמת גידול מספקת, אין לבצע את הבדיקה של Prosigna.

שם לב שכאשר מדובר בגידולים שאיזור שטח הפנים שלהם קטן מ-20 מ"ק, סביר יותר שדרישות ה证实 ה-RNA לא ייענה.

טבלה 5: דרישות מומלצות לזכוכיות נשא בתבונס על איזור שטח הפנים של הגידול

איזור שטח הפנים נמדד של הגידול בזכוכית הצבעה ב-E&H (מ"ק)	מספר זכוכיות הנושא הלא צבועות
6	19-4
3	99-20
1	100 ≤

11.5 בידוד RNA

Veracyte FFPE RNA Extraction ממליצה לשימוש בערכת Veracyte, אשר אושרו במיוחד לשימוש עם **Prosigna**.

ניתן להשתמש בערכות בידוד RNA אחרות כדי להכין דגימות עבור Prosigna אם אלה מפיקות RNA מקטיעי גידול סרטן שד שקובע בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) ומונחים על גבי זכוכית נשאת, העונה על המפרטים הבאים:

טבלה 6: מפרטים של ערכות בידוד RNA

מטרה	בדיקה או מדידה	מפורט
רכיש RNA	כפיפות אופטית ב-nm	$\geq 12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
נפח אלוציאה כולל	נפח אלוציאה כולל	$\geq 12 \mu\text{L}$
טוהר RNA	יחס של כפיפות אופטית ב- nm ל- OD 260/280 (nm)	$2.3-1.7$
זיהום DNA	תוכן DNA גנומי של דגימת שערבה השטיפה (אלוציאיה)	$\leq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$
שלמות RNA המבודד	חלוקת גודל של שביר RNA המבודד חיבטים להווית באורך המבודד	$\geq 90\%$ $> 100 \text{ נוקלאוטידים}$

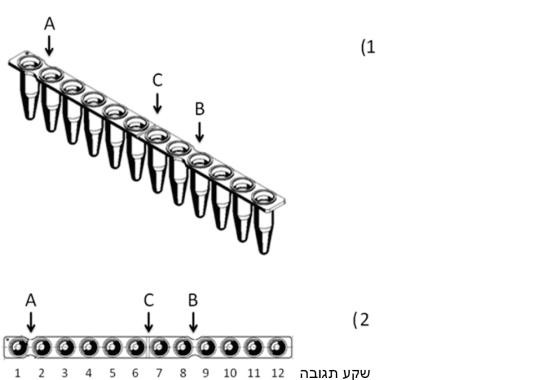
הזריות: אם נעשה שימוש בהילך בידוד חלופי בשילוב עם מכון Prosigna, דרישת עובדה מסוימת זו ייבחר לעבר אינומת מלא על ידי המעבדה לפני השימוש בשגרה.

11.6 הילך בידוד RNA

- אם נעשה שימוש בשילוב Veracyte FFPE RNA של Veracyte, עקב אחר הוראות השימוש כפי שסופקו על ידי Veracyte.

- אם נעשה שימוש בשיטת מיצוי חלופית, עקב אחר הפרוטוקול או המפרטים שניתנו על ידי היצרן.

כל חביתה ערך מיצוי RNA המיצרת על ידי Veracyte מוסמכת לייצר דגימות RNA העמודות במפרטים מוגדרים מראש עבור מבחני ביוטי גנים אבחנתיים. אא עין ביליאן שיטת ערך מיצוי RNA שנבחר / הוראות שימוש לקבלת הוראות אחסון, בטיחות וטיפול מתאימים.



2.2. חשב את כמות RNA והמים (במידת הצורך) שיש להוסיף לתגובה ההכלאה עבור כל דגימה בתוך האצזונה.

א. קלט RNA המומלץ הוא 250 ng עבור הבדיקה. טווח קלט RNA המומלץ הוא $125-500 \text{ ng}$.

ב. חשב את הנפח (במיקורוליטרים) של דגימת RNA-ה מוקובל להכלאה הוא 250 ng . לתגובה ההכלאה על-ידי חילוק קלט הדגימה הרצויה (לדוגמה, 250 ng) ברכיב הנמדד.

ג. אם הרכיב המוחושב של הדגימה הוא בטווח שבין $250 \text{ ng}-1.7 \text{ L}$, והנוסך הוסיף את הנפח המרבי של $10 \mu\text{L}$.

ד. בדמיות הדורשות פחתות מ- $1.7 \mu\text{L}$ ל- $10 \mu\text{L}$, חשב את נפח המים הנדרש כדי ליצור נפח דגימה כולל של $10 \mu\text{L}$.

דוגמה: בדגימה בעלת ריכוז RNA נמדד של $2.9 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ו- 250 ng מים נדרשים כדי ליצור נפח של $10 \mu\text{L}$ לפני הוספת הריאגנטים הנדרשים. במשוואה: $250 \text{ ng} + 2.9 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2.9 \mu\text{L}$

1. מודד את ריכוז RNA המבודד באותו יום העבודה (אחסן בטמפרטורה של $+2$ עד $+8^\circ\text{C}$) או הקפא בטמפרטורה של -70°C ומטה עד לשימוש.

2. מודד את הcpfיפות האופטית (OD) ביחידות 260-nm ו- 280 nm של RNA המבודד באמצעות ספקטרופוטומטר העומד בדרישות המפרטים המוגדרים צוינו בסעיף 10.3 'MRI' ציוד. אל תעביר בעדרת פיטעה את הנפח $1 \mu\text{L}$ מתחילה מהחנת המקור, אם נתנו סיבי זכוכית - הדבר עלול להפריע לקיראה של הcpfיפות האופטית.

3. מלך אחר הזראות היצר של הספקטרופוטומטר למידת RNA.

4. אם דגימה כלשהי אינה עומדת בזיהוי הטווח או ריכוז המינימלי של RNA (טבלה 6), הפה בדינטיפוגה את מבחן הדגימה למשך 12 דקות ב蓁ירות מרבית ($g \times > 10,000$), הנח את המבחן על קרח וחזור על תהליך המודידה. אם הדגימה עדיין לא עומדת בזיהוי הטווח או ריכוז, דגימת RNA אינה מתאימה ליתויו במסגרת הילך הבדיקה של Prosigna. אין להשתמש באיכות או בכמות לא מספקת של RNA בבדיקה של RNA.

5. ניתן לחזור על מיצוי RNA אם הוא אינו עומד במפרט הרכיב או הטווח המינימליים (טבלה 6). המשתמשים יכולים לבחור לבודד זכוכית נוספת. מאותם בлок FFPE או לבחור בлок נפרד מאיתמת מטופלית.

6. אם ריכוז RNA עליה של $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ יש ללול אותו עם מים נטולי RNase ו-DNase בדירוג מולקולרי, ריכוז טורה של $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ לפני ביצוע 200 הצלחה בתוצאות הזרים (Downstream). השתמש בתוצאות הרשומה של יחס cpfיפות OD 260/280 מהדגימה הלא מודולatta כדי לקבוע אם הדגימה המודולatta עומדת בטווח RNA מינימלי של 1.7.

7. הקפא את RNA בטמפרטורה של -70°C ומטה אם לא ניתן לסיים את הבדיקה של Prosigna באותו יום העבודה.

היל'ר תגבורת הבדיקה

הערה: השלבים הבאים מניחים כי מדובר על עשר (10) דגימות של מטופולות ושתי (2) דגימות ייחוס.

הערה: אין להשתמש ב-CodeSet לגלי המדוחות בцентрיפוגה במהלך הבדיקה "מ- $g \times 3,000$ או למשך יותר מ-10 שניות, ואין להשתמש באפשרות "false" (פלויסטם) אם תעsha את הבדיקה, הцентрיפוגה עלולה להגע למיריות מרבות ולהפריד את ה-CodeSet מחוץ לתמיסה.

1. תכנת את הבלוק החימום לפי נפח Lm 30, טמפרטורה מחושבת של הבלוק ושל המסה והגדרת הזמן לאפשרות "forever" (תמיד) (או מקבלת שווה ערך Lm - $g \times 65^{\circ}\text{C}$ (השהה)). הגדר את הטמפרטורה של בלוק החימום ל- 65°C והגדיר את המסה המומס לטמפרטורה של 70°C .

הערה: בשלבים הבאים, חשוב לשומר על הסדר שבו הדגימות נסופות ל מבחנות הרצואה, ולהקפיד על כך שהוא זהה לסדר המופיע ב'מזהה ערכת הבדיקה'. 2. סמן בתווית את המבנה המסתובנות (keyed) ברצועה בעלת 12 השעיפים כדי להבחין בין מקומות 1-6 לבין מקומות 12-7 (ראה איור של המבנה ברצועה).

3. בידית הצריך, תחא את המבנה לשניים כך שתתאים למימי-центрיפוגה עם מתאם של מבחנות ברצועה.

4. העבר בפייטה Lm 10 של דגימת הייחוס למקומות 1 ו-2 של המבנה המסתובנות (keyed) ברצועה.

5. העבר בפייטה את הנפח המוחשב של המדרש עבור כל דגימה למיקום התמאות (keyed) ברצועה.

6. העבר בפייטה את הנפח המוחשב של RNA-ה-CodeSet הנדרש עבור כל דגימה לפחותם במבנה המסתובנות (keyed) ברצועה, באמצעות קצה (טייפ) חדש של פייטה עבור כל דגמה.

7. לאחר ההסופה של כל הדגימות המטופוליט למבחן ברצועה, ממלץ לניה את המבנה במועד המיעעד ל מבחנות דגימה, לשם שמירה על הסדר שבו הדגימה נוספת נסופה ל מבחנה. פועלן זו גונעת להבטיח שהדגימות נספו בסדר הדגימות.

8. לאחר הוספה כל הדגימות ל מבחנות ברגילון העבודה של ערכת הבדיקה לאימות סדר הדגימות.

א. במדית האורך, עורך את 'מזהה ערכת הבדיקה' בעורת תוכנת היישום המזקון כך ששקף את סדר הדגימות בפריטה הסופית (ע"י 'ב'מדריך למשתמש של המערכת Picofuge Counter Analysis System' נ'Counter Analysis System' בקובל הוראות לעירית 'מזהה ערכת הבדיקה' קיימ').

9. לאחר אימות סדר הדגימות, הנה שרב את מבחנות דגימת RNA-ה-CodeSet על ידי המזקון. 9. צור תמיהיל ראשי המכיל Lm 130 של בופר הכהללה ו- Lm 65 של-h-CodeSet וללא המזקון.

הערה: אם ה-CodeSet לגלי המדוחות אוחסן בקרת, אפשר לו להציג לempופרטור החדר למשך 1 דקה לפחות בופר הכהללה.

11. עבר בצעירת פפייטה וורכץ את התמיהיל הראשי למן קצר.

הערה: אין להוציא את ProbeSet לגלי הליידת לתמיהיל הראשי ואין לאחסן את התמיהיל הראשי הסופי בקרת.

12. העבר בצעירת פפייטה Lm 15 מהתמיהיל הראשי לכל אחד מ-12 השעיפים. השתמש בפייטה חדשה לכל שקע.

הערה: לאחר השלמת השלב **Next (הבא)**, יש להניח את המבנה בבלוק החימום בטמפרטורה של 65°C תוך 15 דקות.

13. הוסף Lm 5 של ProbeSet לגלי לכידה לכל אחד מהשקעים, באמצעות טיפ חדש של פייטה עברו כל שקע.

14. כסה את שקי המבנה וערבב את הריאגנטים על-ידי הפיכת המבנה כמנה פעמיים ומכח קלה באצבע כדי להבטיח ערובה מלא.

15. סכני לזמן קצר את הדגימות במבנה המריצה בцентрיפוגה מסווג Picofuge או מימי-центрיפוגה ($\text{g} \times 3000 <$).

הערה: השתמש ב-Picofuge-Shuttle שטפטוליט להיכיל מבחנות ברצועה בעלת 12 שקעים, או במדית הצורך מימי-центрיפוגה שטפטוליט להיכיל מבחנות חתוכות ברצועה.

16. הנת את המבנה בבלוק חימום בטמפרטורה של 65°C עם מכסה מוחום. הכונו לאינקובטור את בדיקות הכהללה בטמפרטורה של 65°C למשך 21-15 דקות, שניות.

ש להשאר את הכהלאות בטמפרטורה של 65°C עד שהן מוכנות לעיבוד בתהנתה.

הכנה.

הערה: השלב CodeSet שלא נעשה בו שימוש.

המשתמש ייצור 'מזהה ערכת הבדיקה' ייחודי עבור כל אכזזה של דגימות, תוך שיוך מזהה הדגימה למיקום המבנה ברצועה (מקומות 1-12) באמצעות Counter System Services. המשמש יכול לעיין 'במדריך למשתמש' לקבלת הוראות Counter Analysis System Services.

1. אם-h-RNA היה אמור ערכת הבדיקה, בצע את השלבים הבאים לפני שימושו:

א. השר את דגימות-h-RNA הפעילה מלאה ואחסן אותן על קרת.

ב. הפקיד באנטיפוגה את דגימת הדגימה שהופשרה למשך 1 דקות

במחירות מרבית ($\text{g} > 10,000$) והוח שוב על קרת.

2. בחר את האגדול המתאים של Prosigna לבדיקה של המטופוליט (1, 2, 4, 3, 2, 1). הוזע המזקף בטמפרטורה 80°C -80°-במחנה המכילה כל אחד מהריאגנטים הבאים של ערכת CodeSet להפשרה. אחסן את הריאגנטים על קרת אם אין מושך מזקף בביבוע השלבים הבאים.

3. א. לגלי מזקף (Prosigna ProbeSet) (מדבקה יוקה על הפקק)

ב. דגימת ייחוס של Prosigna (לא מדבקה על הפקק)

3. הסר את מדבקת הברקווד של מנת-h-CodeSet (CodeSet ProbeSet) והוא צורת בדיקה ממארת-h-CodeSet.

4. באמצעות דפסן אינטרנט, היכנס אל היישום המזקון Counter Analysis System (Run Set ID) ובחר את הבדיקה כדי להתחיל להגדיר את טופוטרי הרישום דיגיטלי.

5. בדף הראשי בחר באפשרות "זרע ערכת הבדיקה חדשה". השדה הראשון הרואש בגדירה של הרצה Run Set ID הוא (Run Set ID) (מצהה ערכת הבדיקה). הזן מצהה ייחודי בשדה Run Set ID (מצהה ערכת הבדיקה). הרוצה כדי להזין את האצזות של הדיגיטות.

6. רוקק או חן באופן יידי את קוד תצוגת הבדיקה ביישום המזקון. לאחר הסריקה או ההזנה, ניתן להשליך אותו.

7. סרוק או הזן באופן יידי את מספר ערכת-h-CodeSet ביישום המזקון. לאחר מכן, הזן את מצהה הדגימה אשר תמצא במאזענות.

8. בדף השישי של רצאות המבנה בדקה מצהה המטופוליט א. הזן את מצהה RNA-ה-CodeSet של המטופוליט באמצעות סורק במרקדים או באופן יידי הזנת מצהה הדגימות בעדרת מקלחת.

9. ב. לאחר הזנה של כל מצהה דגימה, עבר באמצעות Tab למילוי השדות הנדרשים (גודל כולל של הגידול ומצב הקשיות) עבור הדגימה לפני הנטה הדגימה הבאה.

10. השתמש במספר הקשרויות הנגועות שהתגלה במהלך הערקה הפטולוגיות של המטופוליט כדי לבחור את קטגוריות הקשרויות המתאים עבור הבדיקה (4, 3-1, 2).

11. השתמש בגודל הגידול הכלול שנמדד או בשלב שהתגלה במהלך הבדיקה הפטולוגיות של המטופוליט כדי לבחור את קטגוריות גודל הגידול הכלול המתאים עבור הבדיקה (2 ס"מ או < 2 ס"מ).

12. ג. ניתן להזין הערות בשדה האופציוני Memo (תזכיר) עבור כל דגימה.

הערה: אם לא נדרשים מקומות/שקעים כלשהם ברצועת המבנה, השאר את השdots הנותרים ריקים. אם נדרשים שdots נוספים לדגימות, השתמש בתצורת בדיקה אחרת המתאימה למספר רב יותר של דגימות.

13. 10. לאחר השלמת ה贊ת הדגימה, ציין אילו משתמשים יקבלו את המידע הבא:

א. עדכוני מצב עבור הבדיקות 'מזהנת הכהנה' וכיili ניתוח דיגיטלי.

ב. הודעה שהדוחות סופויים.

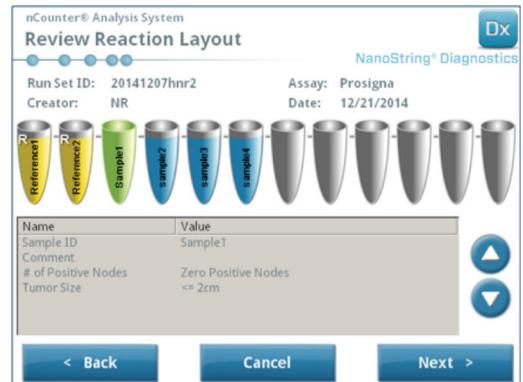
11. שמור את ערכת הבדיקה שהובדה של ערכת הבדיקה, ולהשתמש בו

לשם מעקב אחר הדגימה ולמטרות אחרות.

שימוש הדגימות בתחנת הנקה של nCounter

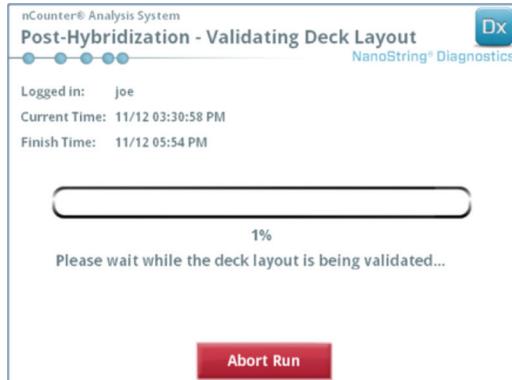
1. אתר את תחנת הנקה המשויכת לכל הניתוח הדיגיטלי.
2. הוציא את מחסנית ה-Counter-*x* מאחסון בטמפרטורה של 20°C – ואפשר לה הגיע לטמפרטורת החדר למשך 15–20 דקות בשיקת האלומינום.
3. כאשר המחסנית מגיעה לטמפרטורת החדר הוציא אותה מארון נסיעות.
4. לפי הנחת המחסנית על גב משטח תחנת הנקה.
5. הוציא את משתני הנקה של Counter-*x* מאחסון בטמפרטורה של 4°C ואפשר לה הגיע לטמפרטורת החדר למשך 15–20 דקות.
6. העלה: משטח הנקה אחד בלבד ודרש להרצות המבוצעות באמצעות ערכת Prosigna המכילה 1,2,3 או 4 בדיקות.
7. הנקה עם החומרם המתכלים של חבילת הנקה של nCounter, בחר את באמצעות משק מסך המגע של תחנת הנקה של *n*.
8. לחץ "Diagnostics" ("דיאגנוטיקה") עבור הביקשה של "Process Samples" ("עד דגימות") במשק מסך המגע (RSID) הזמינים המופיעים על המסך כדי עיין ברישום 'מזה' ערכת הנקה' (RSID) המתייחסים לעד דגימות כדי לאשר את ה-RSID על-ידי מגעה במסך ובחר באפשרות "Next" (הבא).
9. במשק של מסך המגע ואדי שבחורת ב-*RSID* המתאים לעד-ידי בדיקה של כל מבחן על גבי המסך והאמתת פרטי הדגימה בין השים.
10. מבחן על גב המגע ואדי שבחורת ב-*RSID* המתאים לעד-ידי בדיקה של כל א. ניתן לשימוש בגלגל העובה של ערכת הנקה לשם מעקב אחר הדגימה למטרות אמות.
- ב. אם נבחר *RSID* שגוי, גע בלוחן "Back" (חזר) ובחר את מזהה ה-*RSID*-הנקן.
- ג. אם *RSID* היה נכון אך קיימות שגיאות בהזנת הדגימה, גע בלוחן "Back" (חזר) ועboro לתחנת עבודה של המחשב, שם עורך את "Back" (חזר) ב-*RSID* באמצעות היישום המקורי.

איור 7: שימוש מסך הנקה בתחנת הנקה



12. במסכים הבאים לתבוקש לסרוק את מזהי הברקוד של הריאגנטים המבוקשים בשדות הפתוחים או לאשר את מקומם של החומרם המתכלים הנדרשים על גבי משטח התחנה. לאחר ביצוע כל אחת מהמשימות, בחר באפשרות "Next" (הבא) במשק של מסך המגע כדי לעبور להאניה הבא.
13. העלה: משטח הנקה אחד ומבחןת חימום יראה אחת בלבד דרישים להרצות המבוצעות באמצעות ערכת Prosigna המכילה 1,2,3 או 4 בדיקות. להרצות של ערכת המכילה 1,2,3 או 4 בדיקות, הנח את משטח הנקה ומבחןת חימום ריקה במקומות הקדמים שלהם בהתקאה (כי קרוב למשתמש) על גבי משטח תחנת הנקה.
14. הוציא את הדגימות מכלוק החימום. העלה: התחל להריץ את תחנת הנקה תוך 15 דקות מרצע הוצאת הדגימות מכלוק החימום.
15. הורץ את מבחןת הריצה ב-*e-Picofuge* או במיני-צנטריפוגה וורც זמן קצר (5×3000 rpm).
16. השנות במחנות והקווים המנים בתחנת הנקה צריים להיעד על הסדר והכיוון הנכונים של הדגימות.

איור 8: תחנת הנקה לאימות פריסת המשטוח לאחר ההקלאה



23. לאחר אימות פריסת המשטוח, בחר באפשרות "Start Processing" (התחל עיבוד) במשק של מסך המגע.
- הערה: אתה נוכל בעיותה בהפעלת תחנת הנקה, החזר את הדגימות שמקורו לבlok החימום; אבל תחזור מזמן המרבי של 21 שעות.
24. מלא אחר הנקה את תחנת הנקה, הוציא בזירות את המחסנית מתהנתה.
25. לאחר סיום הנקה את השקעים של המחסנית בעדרת היכסו הנדבק המצויר, המיעוד למחסנית.
- הערה: אל תשאיר את המחסנית לא אוטומה בתחנת הנקה במשך הלילה.
26. אם אין מתקoon לסרוק את הדגימות באותו יום, אחסן את המחסנית בטמפרטורה של 4°C במשך שבוע אחד לפחות.

סיקת המחסנית בכל הניתוח הדיגיטלי של nCounter

1. אתר את כל הניתוח הדיגיטלי המקור לתחנת הנקה שיעיבוד את הדגימות. הנח את המחסנית על כל הניתוח הדיגיטלי של Counter-*x* לשיטקה לשיטקה.
- א. פתח את הדלת של כל הניתוח הדיגיטלי.
- ב. הנח את המחסנית שברצונך להוציא ריק.
- ג. סגור את הדלת ועין בתצוגה של מסך המגע.
2. הממשק של מסך המגע של כל הניתוח הדיגיטלי כולל כמה איורים גרפיים שונים שישו לך להוות בקளות את מצב המקיים:
- א. מקום ריק: חוץ זה ריק ומוקן שניינו בו מחסנית חדשה.
- ב. מחסנית כולה מלאה: הסריקה הסטימאה.

אין להזיא את המחסניות הבאות:

- א. מחסנית לבנה: חוץ זה מכיל מחסנית שנרשמה אר לא נסרקה.
- ב. מחסנית כולה חלקיים: חוץ זה מכיל מחסנית הנמצאת בתהיליך סריקה.

3. ניתן להזיא מכל הניתוח הדיגיטלי מחסניות שספירקטן הושלה.
4. אם זו המחסנית הראשונה שהונחה בכל הניתוח הדיגיטלי (Main Menu) ("Diagnostics" ("דיאגנוטיקה")) ולאחר מכן בחר באפשרות "Main Menu" (תפריט ראשי) כדי להיכנס לכל הניתוח הדיגיטלי. אם כל הניתוח הדיגיטלי כבר סורך מחסניות, המשי לשלב 9 להלן.
5. הנח בדרכות את המחסנית בטור חוץ פנוי (ראה הנחיות לגבי מצב המקיים לעיל), בכל הניתוח הדיגיטלי. החרץ והמחסנית מסווגים כדי להבטיח כיון נכון. על הברקוד פונוטן כלפי מעלה.
6. הנח את מכיסת החרץ ולוחץ על המחסנית דרך הפתח שבסכמת החרץ כדי להבטיח שהמחסנית מונחת היטב במקומה.
7. גע בלוחן "Start Counting" (התחל ספירה) והמתן שהטורק יתחל בתהיליך הסריקה. בזמן סכימת הנקה מתחילה מטילה דרכן לסרוק את המחסניות תשמע סדרה של נקודות קבועות.

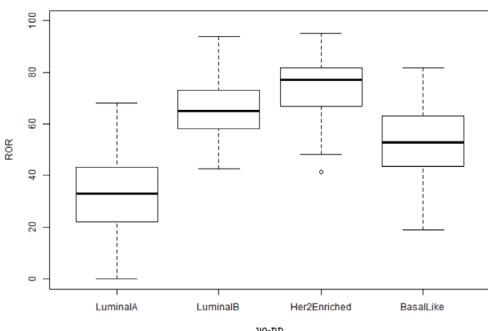
15 הערכות הCEFPIIM

הבדיקה של Prosigna מערבירה דיווח הכלל דירוג ROR (0–100), תת-סוג פני (Basal-like, Luminal B, Luminal A) ו-HER2-enriched (בנוי או גבוי) על מנת לסייע בבחירה סיכון (נוור, ABCSG-8-ATAC (Anastrozole) או טומוקסיפין (Tamoxifen) (בניסויים HR+) אשר יופלו באנטרזהול (ROR) או מיפוי הטווח והשכיחות של קשורות חיזבי (Tumor Ki-67, הרוצף לש ROR להשתברות להישנות מרוחקת לפני מסנן מהיר תקוף קליני אליה, מזג שعروו של ROR לפני תת-סוג פני (איור 9) הCEFPIIM. על סמך מתקדם תקוף קליני אליה, מזג שعروו השירדותו ללא הישנות מרוחקת בטוחו של 10 שנים לפחות בסיכון אליו (12 מטופלות עם מזב קשורות חיבי (3-1 קשורות)).

15.1 טווח ה-ROR לפי תת-סוג

איור 9 מציג תרשימים קופסה של דירוג ROR לפני תת-סוג פני.

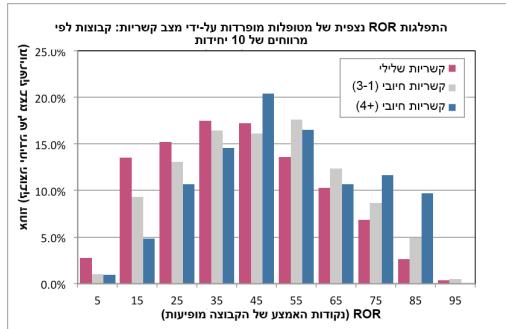
איור 9: תרשימים קופסה של דירוג ROR לפני תת-סוג פני.



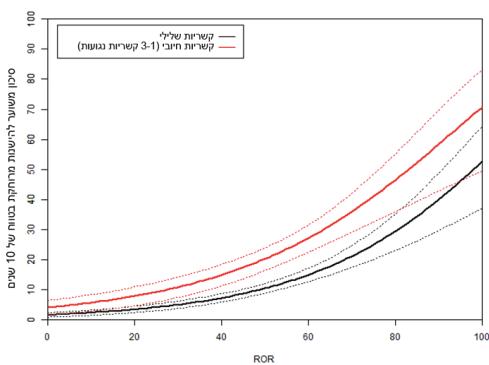
15.2 שכיחות של דירוג ROR לפני מזב קשורות

ההיסטוגרמה באיור 10 נוצרה באמצעות מודל קוקוס יחיד אשר כל דירוג ROR וממשתנים קטגוריים כדי לבחון בין שלוש קבועות הגידול המערב קשורות.

איור 10: ההיסטוגרמה של דירוג ROR וקבוצות מזב קשורות



איור 11: סיכון צפוי משוער בטוחו של>User שנים בתוך קבועת מזב הקשורות



סדרת בקרות של אצוה: דגימת ייחוס RNA שעבירה שעתוק *in vitro* (במעבדה)

דגימת ייחוס של RNA סינטטי כולולה בבדיקה בערכת הבדיקה של Prosigna. דגימת הייחוס מכילה מטרות RNA שעברו שעתוק *in vitro* (במעבדה) מהאלגוריתם לסיוג 50 גנים ו-8 הגנים של התחזקה השוטפה.

דגימת הייחוס מעובדת בכפיפות בכל אחת מהבדיקות המורוצות של Prosigna, עם סדרה של עד 12 דגימות RNA לא-דיאווט שגדיי סרטן שברצואה של 12 מבחנות תגובה. האות מדגם הייחוס מנוחת כנגד ערך סף מוגדרים מראש כדי לאשר את ההרצה.

האות מכל אחד מ-50 הגנים של האלגוריתם בדגימת RNA של גידולי סרטן השם מוגדרת לגנים המתאימים של דגימת הייחוס.

סדרת בקרות חיוביות: מטרות RNA שעברו שעתוק *in vitro* (במעבדה) והgelai המדווד ו-gelai הלכידה המתאים

מטרות RNA סינטטיות משמשות בבדיקות חיוביות (PCs) עבורי הבדיקה של Prosigna. האציגים של מטרת RNA Control מספרית רצפי הדנ"א של External RNA Control Consortium (ERCC) Consortium. מטרת RNA עברו שעתוק *in vitro* (במעבדה) מפלסמידים של dn"a. ש מטרות RNA כוללות בבדיקה בסדרת טיפולו בת 4 שלבים (רכיבון סופי של fM 0.125–128 נסופות לכל PC בתגובה ההכלאה) במקביל הלכידה ולגלאי המדוזה המטאומרים. בבדיקות PC נסופות לכל RNA של סרטן השם ודגימת RNA של גידול הסרטן הנבדקות בעזרת הבדיקה של Prosigna לא תואשר לאניליה נסופת אם עצמות המטרות מטרות RNA PC אין ערך סף שהוגדרו מראש.

סדרת בקרות שליליות: גלאים אקסוגניים ללא מטרות

רצפים של מטרות בעלות בקרה שלילית נגזרים מספרית רצפי הדנ"א של ERCC רצפים שנעדו לאתר את רצפי המטרות הללו כחלק מערכת הבדיקה ללא רצף המטרות המתאים. הבדיקות שליליות NCs (NCs) נסופות לכל קרטר איקוטה. הדגימה מזב קשורות ייחוס הנבדקות בעזרת הבדיקה של Prosigna כמדד של בקרת איקוטה. הדגימה לא תואשר לאניליה נסופת אם עצמות המטרות NC אין עמודות בערך סף שהוגדרו מראש.

סדרת בקרות של מטרות RNA: גנים של תחזקה שוטפה

галאי הלכידה והגלאי המדוזה, שנעדו לאתר את רצפי המטרות הללו כחלק מערכת הבדיקה שוטפה של תחזקה שוטפה ו-50 גנים של אלגוריתם, כולל מטרת RNA Control מטבילה את איקוטה RNA אשר מזב קשורות רקומה שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) וחוץ לבדיקה של Prosigna כמדד של בקרת איקוטה. הדגימה לא תואשר לאניליה נסופת אם רמות הביטוי של הגנים של תחזקה השוטפה קטנות מערך סף שהוגדרו מראש.

הגנים של תחזקה השוטפה משמשים גם לנורמל ההבדלים בכמות RNA השלמה בדגימה לפני נורמל דגימת הייחוס.

14 מגבלות ההליכים

1. בדיקת RNA מזב מזבחה לצורך תת-הסוג הפני של גידול סרטן השם והסיכון של המטופלית להישנות מרוחקת בטוחו של 10 שנים עד דירוג ROR וכטగוריית סיכון, באמצעות RNA טהור אשר מזב קשורות שד אונסית שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) וחווץ לבדיקה של Prosigna. סוגים אחרים של דגימות או חומרקי קבוע לא נבדקו ואין להשתמש בהם.

2. הביצועים של בדיקת RNA מזב מזבחה לצורך אבחנות הלהילכים המופיעים בעלה זה בלבד, המצויר לאירוע. שינויים בהליילכים אלה עשויים לשנות את ביצועי הבדיקה.

3. מאפיינים הביצועים של בדיקת RNA מזב מזבחה עבור נשים לאחר גיל המעבר עם סיכון שקדם בDAL קולון הרומן חיובי, לאחר טיפול אנדרוקריני משלים (אידיג'ובני) שנמשך 5 שנים. ביצועים עם משטר טיפול שונים או בקרבת אוכלי-סיבות של מטופולות אחרות לא הוכחו.

4. אם בדיקה נוספת נסוף RNA בכמות או באיכות מזב קשורות מזב של Prosigna לא תצליח להניב תוצאה מזב קשורות ובמקרה זאת תדועה על כשל של הבדיקה.

5. לשעריך את הפרשנות של תוצאות הבדיקה של RNA (תת-סוג פני), דירוג ROR, כטగוריית סיכון) בשילוב עם גורמים קליניים-פטולוגיים אחרים, ההיסטוריה הרופאית של המטופולות וכל תוצאות הבדיקות של המעבדה.

6. הביצועים של בדיקת RNA מזב מזבחה בעלה מזב RNA העומד במפרטים שהוגדרו ביחס להילך האמור לעיל. ביצועים עם RNA מבודד שמייד במנפרטים אלה, לא הוכחו.

7. חומרים ידועים למטרת RNA בדיקת Prosigna כוללים דנ"א גנומי ורקמה שאינה רקמת גידול (לזוגמה, רקמה תקינה). עין בשיקול הבדיקה הכלליים לפני תחילת הבדיקה. לפני תחילת הבדיקה, על פטולוג לזרות בברור את האזורי של סרטן השם הפולש הירמי מסווג קרצינומה. כמו כן, יש לטפל בכל דגימת RNA עם DNase. לפני שימושה עם דגימת הבדיקה של המטופולות, עליך לבדוק ולאשר כי מונה חדשה של DNase על-פי המפרט המסופק בעית Veracyte FFPE RNA.

16 מאפייני ביצועים

16.1 דיק אגניטי והדירות

כדי לאמוד את מידת הדיק וההדיורות הcoliota של *Prosigna*, נערכו שני מחקרים וונצואלהם שולבו. המבחן הראשון שערך היה מחקר לבדיקת דיק (Precision) של Counter Analysis System (Counter Analysis System) שהחל עם שטוח RNA שטוח סרטי, והמבחן השני היה מבחן לבדיקת הדירות (Reproducibility) שהחל עם רקמת גידול סרטן השד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פפין (FFPE), אשר כלל גורמים טרומ-אנלטיים.

RNA דיק

16.1.1 תוכנן המבחן

מחקר השוואתי אקדמי וסמי נערך בשולשה אטרום עם הבדיקה של *Prosigna* על מערכת RNA משולבות של גידול סרטני שנלקחו מדגימות FFPE. נוצרו חמיש דגימות RNA משולבות של גידול סרטני שנלקחו מדגימות FFPE. פאנל הדיגימות "יצג פרופיל" ביטוי שמותר בארכון – לבדיקה בכל אחד מהאטרומים. פאנל הדיגימות "יצג פרופיל" ביטוי גנים טיפוסיים שהופיעו במהלך בדיקה שגרתית וכל אחת מקבוצות סיווג הסיכון.

כל אחר השלים 18 הריצות תקופות⁹ (הריצות על-ידי כל מפעלי, כאשר כל הריצה כללה 10 בדיקות) לאחר הריצה היכרות שביצוע כל מפעלי (טבלה 11). כל דגימה נבדקה פעמיים במהלך כל הריצה ברמת קלט RNA ומינימלית של 0.0250 עבור הבדיקה. כל מפעיל שולם הריצה אחת ביום תוך עלי-פי התקן המקבול לשיטות של הוצאות ארכון.⁷ תקופת המבחןcoliota, כולל הריצה היכרות, הסתכמה ביוטר 4-שבועות בכל אחר.

טבלה 11: סקירה כללית של מבחן דיק RNA

מספרים		משתנה המבחן						
# דגימות RNA של גידול סרטן השד								
5								
# רפליקציות (שכפול) עדימה לכל הריצה (אותה מחסנית)								
2								
# הריצות/אטרט								
18								
# מפעלים/יום								
1								
# הריצות/אטרט								
2								
# מפעלים/יום/אטרט								
3								
# אטרומים								
3								
סה"כ # דגימות שנבחנו בכל אחר (לא הריצה היכרות)=								
180								
סה"כ # הדגימות =								
540								

16.1.2 ניתוח רכיבי השונות

טבלה 12 מציגה את הפלט מניתוח מרכיבי השונות עבור כל פריט פאנל. מתחת לשונות המשוערת מופיע אחוז השונותcoliota (בסוגרים).

טבלה 12: מרכיבי השונות לפי פריט פאנל (דגימת RNA משולבות)

סה"כ סטיית תקן (SD)	שונותcoliota	מרכיב שונות						פריט פאנל לפי סיכון, תת-טוג
		בתוכה הריצה	הריצה	מפעלי	אחר	מננה	ממוצע ROR	
0.66	0.44 (100%)	0.296 (67%)	0.134 (30%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.010 (2%)	31.4	גנרי Luminal A
0.76	0.576 (100%)	0.426 (74%)	0.046 (8%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.105 (18%)	55	בינוי Luminal B
0.55	0.299 (100%)	0.194 (65%)	0.046 (15%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.059 (20%)	55.4	בינוי Basal-like
0.76	0.576 (100%)	0.380 (66%)	0.064 (11%)	0.000 (0%)	0.014 (2%)	0.119 (21%)	64.8	גבוה Luminal B
0.66	0.442 (100%)	0.277 (63%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.165 (0%)	0.37% (37%)	76.2	גבוה HER2-enriched

עבור כל חמשת פריטי הפאנל הפאנל, סטיית התקןcoliota הייתה קסומה מ-1 יחידה ROR בסולם של 0–100. עבור כל פריטי הפאנל, מרבית השונות מקורה בשונות בתוך הריצה (הדיורות). כמעט ולא הופעה שונות בין אטרט-אלטר או שונות בין מפעלי-למפעלי. בדיקת יחס יתרות (Likelihood ratio test) למובאות של אטרט לפירט פאנל גילתה שההבדלים באטרט היו בלתי מובהקים מבחןינה סטטיסטיות (p > 0.05). עבור כל מנה, דירוגי ה-ROR הממוצעים קטנים מ-1 יחידת ROR בנפרד לכל פריט פאנל, מה שתRam כ-20% בממוצע לשונותcoliota.

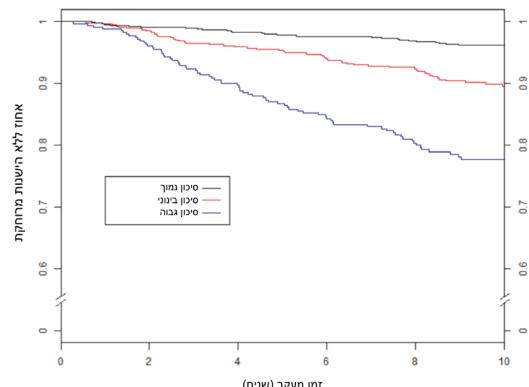
16.1.3 שיעור קונקורדנציה של קריאת תת-טוג וסיכון

עבור כל פריטי הפאנל התגלה שיעור קונקורדנציה של 100% בין תוצאות תחת-טוג לתה-טוג הפנימי של פריטי הפאנל. בכל הדיגימות התגלה שיעור קונקורדנציה של 100% בין קובוצת הסיכון הנזدة והציפייה.

15.3 שיעור היסודות ללא הישנות מרווחת לפי סיכון סיכון

הנתונים הבאים לקווים מהניתוח המשולב של הניסויים TransATAC-ROR לערכי סיכון מראש עבר מטופולות עם מצב קשריות שלילי או חיובי. אירום 12 ו-13 מציגים את שיעור ההישנות מרווחת ללא הישנות מרווחת בטוחה של 10 שנים עברו מל-קובוצת קטגוריות סיכון לפי מצב קשריות.

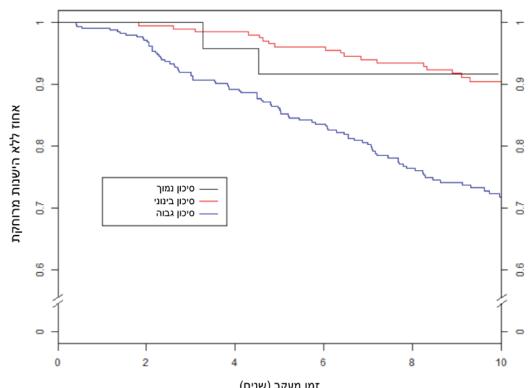
איור 12: DRFS לפי קובוצת סיכון בקרוב מטופולות עם מצב קשריות שלילי



סיכון נתוני עבור איור 12 DRFS לפי קובוצת סיכון בקרוב מטופולות עם מצב קשריות שלילי

קובוצת סיכון	מטופולות (%)	מספר אירועים לארוך 10 שנים [95% CI]	בטווח של 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרווחת
נמוך	(49%) 875	[97.3% - 94.7%] 96.2%	31	
בינוי	(31%) 551	[91.7% - 86.1%] 89.2%	53	
גבוה	(20%) 360	[81.9% - 72.8%] 77.7%	73	
מה"כ	(100%) 1,786		157	

איור 13: DRFS לפי קובוצת סיכון בקרוב מטופולות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכון נתוני עבור איור 13 DRFS לפי קובוצת סיכון בקרוב מטופולות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)

קובוצת סיכון	מטופולות (%)	מספר אירועים לארוך 10 שנים [95% CI]	בטווח של 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרווחת
נמוך	(4%) 24	[97.8% - 70.6%] 91.7%	2	
בינוי	(36%) 211	[93.9% - 85.2%] 90.4%	18	
גבוה	(60%) 355	[76.6% - 66.3%] 71.8%	87	
מה"כ	(100%) 590		107	

טבלה 10: שיעורי DRFS בטוחה של עשר שנים בקרוב מטופולות עם 4 קשריות נגעות ומעלה

קובוצת סיכון	מטופולות	מספר אירועים לארוך 10 שנים [95% CI]	מרווחת בטוחה של 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות
גבוה	103	39	[67.0% - 46.3%] 57.4%	

הדיםות הרקמה

16.1.4 תכנן המבחן

מחקר השוואתי אקראי וסמי שunner בשלושה אתרים השתמש בדגימות רקהמeh Counter Analysis System באמצעות סרטן שד, הליקות מואוטו גוש FFPE, שנבדקו במערכת prosigna. סדרה של 43 דגימות רקהמeh של סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו במשך פרפין (FFPE) שנלקחו לאחורה מטיפות עם סרטן שד בעל גידול קולוטן הורמוני חיוני, ואוחכון כובלות קרצינומה ווקטילית / או לובלריה פולשנית. כל דגימות רקהמeh נשלהו לאטר המהאים לעדר 43. הדגימות נבדקו באופן בלתי-תלוי על-ידי שלושה פטולוגים נפרדים. בכל דגימה שנבדקה על-ידי מטולוג בוצעו ההליכים הבאים: הרצת מבון שנכללה מאקרו-דייסקציה של RNA, מציאי RNA וביצוע הבדיקה של prosigna על-ידי מפעיל אחד בכל אטר, בעזרת הליך הבדיקה המוגדר. RNA-ה-בבודד מכל את מטיפות הרקהמeh בדק פעמיים בהרצות בדיקה נפרדות. לצורך ביצוע המחקר נעשה שימוש בשלוש מנוגת של ערכות בידוד RNA (אחת לכלי אטר) ובמנוגת יחידה של ריאגנטים של ערכת הבדיקה. זוכחת ונשא אחת הזונה למיצוי RNA כאשר אזור שטח הפנים של הגידול היה $\geq 100 \text{ mm}^2$, כאשר 3-זכוכיות נשא חזון כאשר אזור שטח הפנים של הגידול היה $> 100 \text{ mm}^2$, כאשר דרישת המינימום לאזר שטח הפנים של הגידול הייתה 4 mm^2 .

16.1.5 סיכון הבדיקה

שיעור הקרייה (Call rate) של 43 דגימות רקהמeh שנבדקו בכל אחד משולשת האתרים מופיע בטבלה 13.

טבלה 13: שיעור הקרייה בכל אטר

אטר	שיעור קרייה	אחוזים שהניבו תוצאה
1	41/43	95%
2	40/43	93%
3	43/43	100%

40 דגימות הניבו תוצאות בכל האתרים (נדישה חזרה על בידוד RNA של דגימה אחת באטר אחד), 1 דגימה הביבה תוצאות ב-2 אתרים, ו-2 דגימות הניבו תוצאות באטר אחד. מאה אחוז (100%) מהדגימות שעברו את מפרטיו של prosigna בידוד RNA הניבו תוצאות עבורות בבדיקה של RNA. אזור שטח הפנים הנמדד של הגידול ל-4/5 כשלים של בידוד RNA היה $\geq 100 \text{ mm}^2$, השווה לערך קטן מ-50 mm^2 של סה"כ רקהמeh לפי קלט אזר בבדיקה.

43 הדגימות כללו מטיפות בעלות מצב קשריות שלילי וחובי אחד. תוצאות הבדיקה שחושבו מ-43 הדגימות מייצגות טווח (94% IQR), את כל 4 התת-סוגים הפנימיים ואת כל קטרוגיות הסיכון כאשר מחלים את ערכי הסופ (Cutoffs) של מצב קשריות שלילי או מצב קשריות חיוני על כל הדגימות. שתי הדגימות עם התוצאות באטר אחד לא נכללו בכל הניתוחים הסטטיסטיים שbowcu לאחר מכן מארח של האנו נזונים זמינים להשוואה בין אתרים.

16.1.6 ניתוח ריבבי השונות

לא נמצא הבדלים מובהקים סטטיסטיים ($p = 0.05$) בין קטרוגיות סיכון במבחן קרווסקל-ואליס (Kruskal-Wallis) א-פרמטרי, لكن מודל מרכיבי השונות הנותן בכל קטרוגיות הסיכון בו-זמןית.

טבלה 14 מציגה את התוצאות של ניתוח מרכיבי השונות אשר השתמש בכל 41 דגימות הרקהמeh.

טבלה 14: מרכיבי השונות (מחקן הדדים הרקהמeh)

אטר	שיעור קרייה השונות (SD)	שיעור קרייה השונות (SD)	שיעור קרייה השונות (SD)
0.10	7.72	0.51	8.34

המרקם "אטר" מודד שונות שיטתיות ספציפית לאטר, המרכיב "בתוך בלוק" מודד את השונות האקראית המשנה כפונקציה של סקירה/עיבוד דגימת הרקהמeh או השונות בתוך בלוק FFPE, והשונות השוירית מודדת את ההשתנות המשולבת של הרצה-להרצה והשתנות בתוך-הרצתה בבדיקה של prosigna. המרכיב "אטר" קטן מודד ביחס להשתנות האקראית בתוך הבלוק, עובדה המUIDה על קר שזהבדים נמוכים בין האתרים הוי זניחים ($> 1\%$ מהשתנות הכוללת). השונות השוירית תאמה להשתנות שוות-הערך שנמדדה בבדיקה דיקון RNA-ה-בידוד על כל פחות דינמיות, אך יותר מידי שכפול (0.51) שנות בהשוואה לאטר ייחיד מופיע בשנות מנת ריאגנטים ב-*onchocerca* prosigna של 0.39 עבור מחקר דיקון RNA.

טבלה 15 מסכמת את ההשתנות הכוללת בעזרת הסכום של השונות עיבוד הרקהמeh (המרקם "אטר" ו"בתוך הבלוק" מטבלה 14 של מחקר זה), וכן השונות עיבוד RNA-ה-בידוד מטבלה 12 (הממוצע בין קשותים לעיבוד הרקהמeh המפערת הפאנלי שבדקנו בטבלה 12). גורמים טרומ-אנליטיים קשורים לעיבוד הרקהמeh הם מקור השונות העיקרי עיבוד הבדיקה (94%). סה"כ סטיית התקן (SD) (SD), יכול כל מקורות השונות, שווה ל-2.9, לעומת המUIDה על קר שבדקה של prosigna היא מודד מהימן של prosigna בין שני ערכי ROR של 6.75 ברמת ביטחון של 95%.

טבלה 15: השונות הכוללת (עיבוד הרקהמeh ועיבוד RNA-ה-בידוד)

השתנות עיבוד הרקהמeh	השתנות עיבוד RNA-ה-בידוד	סה"כ סטיית התקן (SD)
2.9	8.29	0.47

16.1.7 שיעור קונקורדנציה של קטגוריות סיכון וסיווג תחת-סוג

שיעור הקונקורדנציה באטר-לאטר לפ-תת-הסוג וסיווג הסיכון של המטיפות (סיכון נמוך/בינוני/גבוה) מופיע בטבלה 16, שם הוחלו ערכי הסוף (Cutoffs) של הסיווגים מצב קשריות שלילי או מצב קשריות חיוני על כל הדגימות. רמות הסיכון של 95% מאותו סוג מסווגות בסוגרים מרובעים ומספר הדרגות עם תוצאות בשני האתרים מופיע בסוגרים. שיעור הקונקורדנציה בשני שלבים. ואית, היחס בין ארבעת דוגות-התוצאות האפטרים (שנים באטר 1 * שנים באטר 2) שחותמיו, וחשב עיבוד כל דגימות הרקהמeh אשר יצרו תוצאות בשני האתרים בהשוואה הנתונה. הללו בכל דגימות הרקהמeh אשר יצרו תוצאות בשני האתרים בהשוואה הנתונה.

טבלה 16: סיכון של שיעור הקונקורדנציה של התת-סוגים וקטגוריות סיכון לפ-מי מצב הקשריות

שיעור קונקורדנציה ממוצע	שיעור קונקורדנציה של כל סוג				סוג השוואה
	אטר 2 לעומת אטר 3 (n = 40)	אטר 1 לעומת אטר 3 (n = 41)	אטר 1 לעומת אטר 2 (n = 40)	תת-סוג	
97%	95% [99.3% - 83.1%]	98.8% [100% - 91.0%]	96.3% [99.5% - 86.4%]		
90%	90% [97.2% - 76.4%]	92.7% [98.4% - 80.1%]	87.5% [95.8% - 73.2%]	קטגוריות סיכון קשירות-שלילי	
91%	91.3% [97.4% - 79.2%]	92.7% [98.4% - 80.1%]	88.8% [96.0% - 75.9%]	קטגוריות סיכון קשירות-חיוני	

עבור כל השוואה (תת-סוג וקטגוריות סיכון של מצב קשריות שלילי ומצב קשריות חיוני), שיעור הקונקורדנציה הממוצע בין האתרים היה לפחות 90%. לא היו דגימות שהבחנו קטגוריות הסיכון השתנתנה מסיכון נמוך לסיכון גבוה (או להיפך) בין אתרים או בתוך אתרים. היי 2 דגימות בלבד (מתוך 41) שלא הניבו תת-סוגים זהים בין כל 6 השכפולים:

1. דגימה אחת הניבה תוצאות כפולות של A ב-*Luminal A* וב-*Luminal B* בכל אחד משני האתרים האחרים.
2. דגימה אחת הניבה תוצאות כפולות של A ב-*Luminal A* בתוך HER2-enriched ב-*Luminal A* וב-*Luminal B*.HER2-enriched-*Luminal A* -HER2-enriched-*Luminal A* -*Luminal B*.

16.2 רגישות / פלט RNA

תיאור מחקר קלט RNA

המחקר בדק 13 דגימות RNA מגידול סרן ש-ב-3 רמות קלט RNA שונות במפרט הבדיקה (500, 125 ו-250 ng) ושתי רמות קלט RNA נסומפות מוחץ למפרט (625) מוג. כל דגימה בדקתה עם אחת מנוגת הערכה (סה"כ 2 מנות) בהרצות בוחן את, אשר כללה מדידות כפולות בכל רמה של מפרט ומדידה אחת עבור כל רמה מוחץ למפרט. מדידות ריקות (כלומר, ללא מטרה) ריקות נכללו בכל הרצות מבחוץ. דגימה ייחידה נבדקה עםמנה יחידה בלבד.

תוצאות מחקר קלט RNA

כל הדגימות הריקות שנמדדו (46 = ח) גלו ערכים הרבה יותר מאשר נमוכים מערכ הסף של האות והניבו תוצאות כפולות של הבדיקה (שיעור קראיה 0%). כל מדידות RNA-ה-בידוד נבדקו במפרט הבדיקה (138 = ח) היבו תוצאות עוברת של הבדיקה (שיעור קראיה 625) (100%). מאה אחוז (100%) המדידות עם רמת קלט מועל לרמה המUIDת במפרט (625) (10/12). הניבו תוצאות בדיקה שנבדקו עם רמת קלט מותאמת לרמה המUIDת במפרט (62.5) הניבו תוצאות בדיקה ב-100% במונה 1 עם 100% במונה 2.

הפרעה של רקמה נמקית, מדמתת וركמת DCIS (קריצינומה דוקטלית לא כודרנית)

כדי לאמוד את הסיכון לדיזיהות תוצאות הבדיקה על-ידי רקמה נמקית/מדמתת/רקמת DCIS, נבדקו 11 בלוקים של סרטן שד שקובעים בפרופין (FFPE) 3 של רקמת DCIS 5, DCIS של רקמה נמקית, 3, של רקמה מדמתת (FFPE) סרטן שד פולשני שאושר על-ידי פתולוג, וכ- 30%-10% מורקמה המפרעה נבדקו - עם ולא מאקרו-דייסקציה של הרקמה המפיעיה, ונקבע ההבדל בדיאוג- ROR (דلتא ROR). בرمאות שנבדקו, האפקט של הדם/הרקמה המדמתה, רקמת DCIS הרקמה הנמקית שנכללו בתהילר היה צניח מבינית דיאוג- ROR שווה (> 6 ייחדות (ROR)). נמצא שיעור קונקורדנציה של 100% בה качאת קטגורית התקין בין 11 הדגימות טכלו, רקמה נמקית, מדמתת וركמת DCIS עם ולא מאקרו-דייסקציה.

דנ"א גנומי אנושי

היל'ר הבדיקה של Prosigna כולל הסירה של דנ"א גנומי אנושי (DNA) על-ידי עיכול באמצעות DNase. כדי לאמוד את הסיכון לדיזיהות תוצאות המבחן על-ידי gDNA, נבדקו עשרה (10) בלוקים של גודל סרטן שד שקובעו בפורמיין ונסמכו בתור פרופין (FFPE) המכילים קריצינומה ודקינית פולשנית שאושר על-ידי פתולוג, עם וללא (+/-) הרה של דנ"א גנומי אנושי, על-ידי השמשת שלב-h DNase-היל'ר. בדגימות שנבדקו, בממוצע, דיאוג- ROR היה נמוך ב-4 עד 5 ייחדות בקבוצות התקין "גנו" ו"בונן" כאשר DNase-g הוסיף באחוזות I DNase (ראה טבלה 18). כאשר הדגימות שלא טפלו באחוזות DNase-I, טפלו לאחר מכן ב-I (לאחר הטיפול), דיאוג- ROR תאמו לערכי ROR שנצפו במרקם בטיפול ה- DNase שנכללו בפרוטוקול. קיטס סיכון שדיאוג- ROR שدواו יציג הערכת יתר של הדירוג בנקודות או הטיה חוויבת של הדירוג בנקודות (עד 7 ייחדות (ROR)) לגבי הסיכון להישנות המחללה בקשר למטען DNase g. כמו כן, האות שחווב בעבור דגימות שלא טפלו ב-I DNase היה נמוך באופן מובהק (< 0.05).

הדגימות שטופלו ב-I Prosigna לפניו ביצוע הבדיקה של RNA-היל'ר המשמשת לכימיות RNA-היל'ר.

טבלה 18: השפעת הטיפול עם DNase על שיעור-ה ROR בדגימות הגידול

הבדל בשיעור DNase - DNase - Um I (לאחר הטיפול)			הבדל בשיעור DNase - Um I DNase - לא I (לאחר הטיפול)			דגםות FFPE	硕果	ROR
ממוצע	מינ'	מקס'	ממוצע	מינ'	מקס'			
3.0	-1.0	0.7	-1.0	-6.0	-4.0	3	נמוך	בוני
2.0	0.0	1.0	-2.0	-7.0	-4.5	2	בוני	גביה
1.0	-1.0	0.4	2.0	-1.0	0.4	5	גביה	גביה

16.4 ביצועים קליניים

שי מוחרי תיוקן קליני בוצעו כדי לתקף את בדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטון שד לביקורת ממד פרוגנוסטי. היעד הראשון של שני המarkers היל'ר העיקן תקף לממצאים שפורסמו כי דיאוג- הסיכון להישנות המחללה (ROR) מספק מידע פרוגנוסטי נוסף לשערוי הירשות לא הישנות מרווחת בתוכו של 10 שנים, הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים. כמו כן, התשראה החשונית משני המarkers בקשה לתקף מצאים קזודמים שמשמעותם בעלות גודלים מסווג A-B-Luminal A ו-B-Luminal B. היל'ר בעלות שיעור הירשות ללא הישנות מרווחת בתוכו של 10 שנים שהוא שונה סטטיסטיamente מאחר שקריטריון ההזנה וההתוצאות של שני המarkers היו דומים, שכן מסדי הנתונים שלו ונותו בdegrees תוצאות אנגלו-מוגדרת בצהורה פרוספקטיבית (מתוך ראייה לעתיד), אשר כללה יעדים שהיו לעדי המבחן.

ניתוח משולב: יצירת עקומת סיכון בעדרת תוצאות מושלבות של ABCSG-8 TransATAC Prosigna

נתן למצואים של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים בניתוח המשולב בהמשך העלן. תוכנן המבחן ולפרטי הניתוח בכל מהAKER, עיין בסעיפים הבאים 1-2, בהתאם.

דרוג-ה ROR הממוצע עבור 13 הדגימות כיסה טווח רחב (82-20). שיעור הקונקורדנציה של סיוג קבועות התקין (نمוך/בינוני/גבוה) תאום ב-100% בכל רמות הקלט של RNA-היל'ר עבור 13 הדגימות שנבדקו. טבלה 17 מסכמת את השונות בדרוג-ה ROR כפונקציה של RNA. ההבדל הממוצע בדרוג-ה ROR בין רמות הקלט של RNA, RNA, RNA, סטיית התקין של הבדלים והרוחה בר-マーク של 90% שימושו את החוקרים כדי לבדוק אם דיאוג- ROR שנצחו מרווחת קלט שונות של RNA השתנו לאלה שנצחו באמצעות רמת מטרה של 250. כדי לעמוד בקריטריון הקבלה, הרוחה בר-マーק חייל להיות בטוחה של (-3,3 ROR). בשתי רמות התקינות של סיכון רשות מרופט הביקלה (רמת RNA של 125 ו-500, דיאוג- ROR השתו ל-125 מטרה של 250 עבור כל דירוגים שהשתנו בדיאוג- ROR השתו ל-125 מטרה של אחד מתבניהם, אך לא לשני).

טבלה 17: סיכון הבדלים בין דיאוג- ROR. הספירה זהה למספר הדגימות הכלולות בניתוח.

ערכות	מזה (ng)	ספירה	ROR ממוצע	的地步ל של הדגימות	סטיית התקין של רמת בטיחון	גובה על-ידי בטיחון של רמת בטיחון	גובה על-ידי בטיחון
20535	250 - 62.5	10	1.90	2.62	0.54	3.26	3.26
	250 - 125	12	0.75	1.23	0.16	1.34	1.34
	250 - 500	12	0.04	0.78	-0.33	0.41	0.41
	250 - 625	12	-0.13	0.86	-0.53	0.28	0.28
20536	250 - 62.5	11	-0.36	3.96	-2.33	1.60	1.60
	250 - 125	11	-0.50	3.07	-2.02	1.02	1.02
	250 - 500	11	-0.82	3.25	-2.43	0.79	0.79
	250 - 625	11	-1.09	4.24	-3.19	1.01	1.01

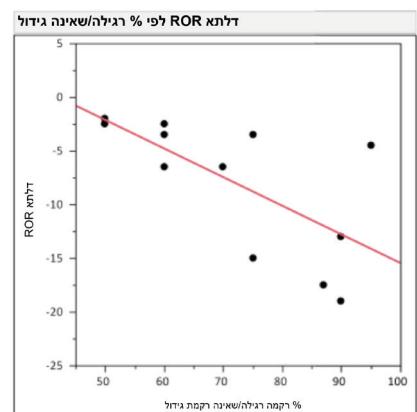
16.3 בדיקת הפרעות

ракמה סמכה רגילה/שאגינה רקמת גידול

לרוב, הבלוקים של גידול סרטן השד שקובעו בגילה/שאגינה בפורמיין, ונשמרו בתור פרופין (FFPE) כוללים רקמה סמכה רגילה/שאגינה רקמת גידול, וכן לחהותה בבדיקה Prosigna של רמות פוטולוגיות כאזרור נפרד מהאזור של סרטן השד הפלוני. היל'ר הבדיקה של Prosigna האמור לעלי מנהה להסיק את הרקמה הסמכה הרגילה באמצעות מאקרו-דייסקציה. כדי לאמוד את הסיכון להישנות המחללה (FFPE) ב-13 בלוקים של סרטן דקיננה דוקטילית פולשנית שאושר על-ידי בפורמיין, ונשמרו בתור פרופין (FFPE) בעלי קריצינומה גידול -ם ולא מאקרו-דייסקציה (דلتא ROR).

בממוצע, שיעור-ה ROR של דגימת הגידול שבעברה מאקרו-דייסקציה הסתכם ב-8-8 ייחדות ROR יותר מהשיעור הנכפה כאשר הרקמה הרגילה/שאגינה רקמת גידול לא הוסרה. אירוו 14 מקרה שכלל שכבות הרקמה הרגילה גדלה (עד 95% מהרकמה לא הוסרו במאקרו-דייסקציה) קיטס סיכון גידול יותר שדרוג- ROR שدواו יציג הערכת חסר של הדירוג בנקודות או הטיה של דירוג בנקודות (עד 19 ייחדות ROR) lagi. השפעת הרקמה הסמכה, ונקבע ההבדל בדיאוג- ROR (דلتא ROR).

איור 14: השפעת הרקמה הרגילה/שאגינה רקמת גידול על שיעור הדלתא ROR



טבלה 19: סיכום של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים בניתוח המשולב של מחקרים 1 ו-2

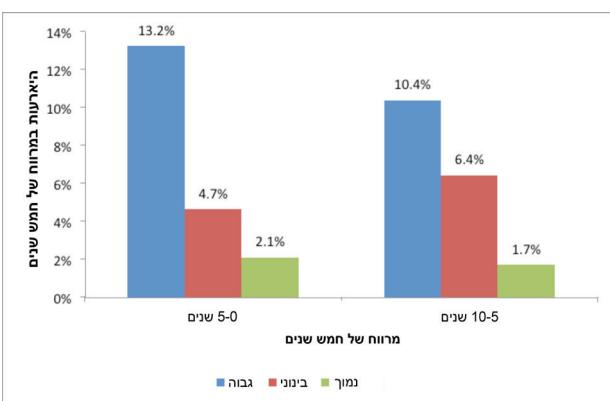
מאפיין	ער	4 קשריות נגועות (n = 103)						3-1 קשריות נגועות (n = 590)						קשירות-שלילי (n = 1,786)					
		ABC8G (n = 49)	Trans ATAC (n = 54)	ABC8G (n = 382)	Trans ATAC (n = 208)	ABC8G (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 739)	ABC8G (n = 103)	Trans ATAC (n = 590)	קשירות-שלילי (n = 1,786)	ABC8G (n = 103)	Trans ATAC (n = 590)	קשירות-שלילי (n = 1,786)						
טיפול	מעט אנטסרזול (Anastrozole)	25 (51.0%)	31 (57.4%)	184 (48.2%)	102 (49.0%)	528 (50.4%)	377 (51.0%)	25 (49.0%)	23 (42.6%)	184 (48.2%)	102 (49.0%)	528 (50.4%)	377 (51.0%)						
	טומוקסיפין (Tamoxifen) בלבד	24 (49.0%)	23 (42.6%)	198 (51.8%)	106 (51.0%)	519 (49.6%)	362 (49.0%)	0 (0%)	14 (25.9%)	0 (0%)	47 (22.6%)	0 (0%)	132 (17.9%)						
שלב	G1	7 (14.3%)	3 (5.6%)	54 (14.1%)	39 (18.8%)	210 (20.1%)	169 (22.9%)	7 (14.3%)	3 (5.6%)	54 (14.1%)	39 (18.8%)	210 (20.1%)	169 (22.9%)						
	G2/GX	42 (85.7%)	37 (68.5%)	328 (85.9%)	122 (58.7%)	837 (79.9%)	438 (59.3%)	42 (85.7%)	37 (68.5%)	328 (85.9%)	122 (58.7%)	837 (79.9%)	438 (59.3%)						
	G3	0 (0%)	14 (25.9%)	0 (0%)	47 (22.6%)	0 (0%)	132 (17.9%)	0 (0%)	14 (25.9%)	0 (0%)	47 (22.6%)	0 (0%)	132 (17.9%)						
גודל הגוף	≥ 5"מ	2 (4.1%)	3 (5.6%)	37 (9.7%)	13 (6.2%)	219 (20.9%)	122 (16.5%)	2 (4.1%)	3 (5.6%)	37 (9.7%)	13 (6.2%)	219 (20.9%)	122 (16.5%)						
	2-1 5"מ	18 (36.7%)	15 (27.8%)	193 (50.5%)	83 (39.9%)	568 (54.3%)	420 (56.8%)	18 (36.7%)	15 (27.8%)	193 (50.5%)	83 (39.9%)	568 (54.3%)	420 (56.8%)						
	3-2 5"מ	23 (46.9%)	18 (33.3%)	122 (31.9%)	77 (37.0%)	213 (20.3%)	157 (21.2%)	23 (46.9%)	18 (33.3%)	122 (31.9%)	77 (37.0%)	213 (20.3%)	157 (21.2%)						
HER2	< 3"מ	6 (12.2%)	18 (33.3%)	30 (7.9%)	35 (16.8%)	47 (4.5%)	40 (5.4%)	6 (12.2%)	18 (33.3%)	30 (7.9%)	35 (16.8%)	47 (4.5%)	40 (5.4%)						
	שלילי	46 (93.9%)	47 (87.0%)	367 (96.1%)	186 (89.4%)	984 (94.0%)	649 (87.8%)	46 (93.9%)	47 (87.0%)	367 (96.1%)	186 (89.4%)	984 (94.0%)	649 (87.8%)						
	חיובי	3 (6.1%)	7 (13.0%)	15 (3.9%)	22 (10.6%)	63 (6.0%)	90 (12.2%)	3 (6.1%)	7 (13.0%)	15 (3.9%)	22 (10.6%)	63 (6.0%)	90 (12.2%)						
סוגי השינוי	מרוחקת	10 (20.4%)	31 (57.4%)	64 (16.8%)	50 (24.0%)	91 (8.7%)	79 (10.7%)	10 (20.4%)	31 (57.4%)	64 (16.8%)	50 (24.0%)	91 (8.7%)	79 (10.7%)						
	כל הינויות	10 (20.4%)	34 (63.0%)	73 (19.1%)	59 (28.4%)	121 (11.6%)	117 (15.8%)	10 (20.4%)	34 (63.0%)	73 (19.1%)	59 (28.4%)	121 (11.6%)	117 (15.8%)						
	Luminal A	31 (63.3%)	31 (57.4%)	248 (64.9%)	127 (61.1%)	725 (69.2%)	529 (71.6%)	31 (63.3%)	31 (57.4%)	248 (64.9%)	127 (61.1%)	725 (69.2%)	529 (71.6%)						
תת-סוג פנומי	Luminal B	16 (32.7%)	20 (37%)	118 (30.9%)	68 (32.7%)	284 (27.1%)	176 (23.8%)	16 (32.7%)	20 (37%)	118 (30.9%)	68 (32.7%)	284 (27.1%)	176 (23.8%)						
	Basal-Like	0 (0%)	0 (0%)	2 (0.5%)	2 (1.0%)	6 (0.6%)	7 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0.5%)	2 (1.0%)	6 (0.6%)	7 (0.9%)						
	HER2-Enriched	2 (4.1%)	3 (5.6%)	14 (3.7%)	11 (5.3%)	32 (3.1%)	27 (3.7%)	2 (4.1%)	3 (5.6%)	14 (3.7%)	11 (5.3%)	32 (3.1%)	27 (3.7%)						

שני המקרים כללו טיפול טריפול שכלל 5 שנות טיפול בטומוקסיפין (Tamoxifen). במחקר TransATAC, דו-עה מהמחקר הקודם כללה 5 שנות טיפול בטומוקסיפין (Anastrozole), ולאחריו במחקר ABCSG-8 אבדרונו השניה כללה שנתיים טיפול בטומוקסיפין ולאחריה 3 שנות טיפול באנטסרזול. כאשר נערך מודול של השינוי מרוחקת (DR) כפונקציה של המותנים הקליניים והטיפולוגיים, הטיפול לא תרם באופן מובהק ($P = 0.66$) (כגון המנובא, DR, הבדלים העיקריים בין ניסויים אלה היו העדפה שהণוטה השמינית DR ליל מוגפות עם רוכן בשלב 3, ושיעור ההשינויים הכלול היה גבוה יותר במחקר TransATAC מאשר במחקר ABCSG-8.

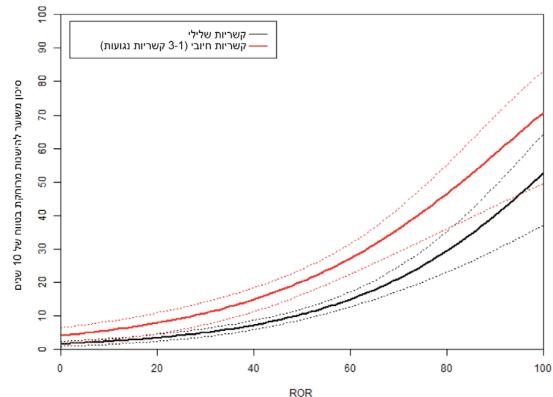
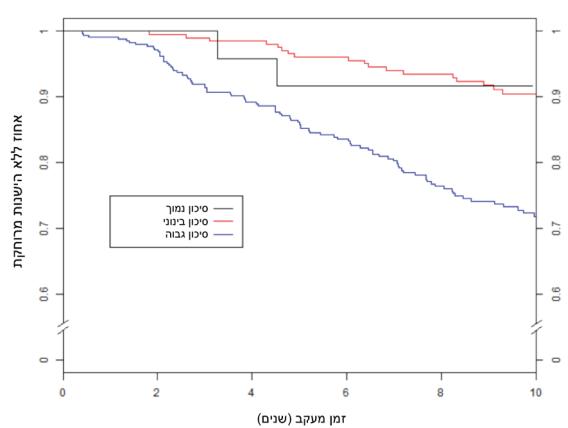
תוצאות

איור 15 מציג את הסיכון לה שינוי מרוחקת (DR) במשך 10 שנים כפונקציה של DRog ROR עם רמות בייחון של 95% בהתקבוס על דגמי הסיכון הפרופורציונליים של קוקס עבור כל קבוצת מטופלים במצב קשריות שלילי ובמצבי קשריות חיובי (3-1 קשריות נגועות).

איור 15: הסיכון המשוער לה שינוי מרוחקת (DR) במשך 10 שנים לפחות קשריות עם רמות סיכון של 95%



איור 15: DRFS A: לפ' קבוצת סיכון בקשר למטופלים עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות נגועות

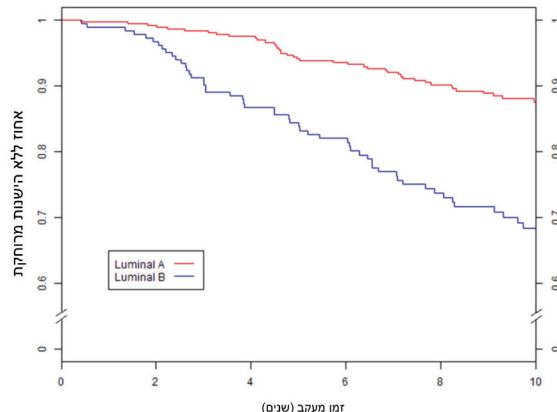


סיכום נתונים עבור אירור 18 עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות	לאורך 10 שנים	מספר אירועים	בטוחו של 10 שנים [95% CI]	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת
Luminal A	1,254	62	94.6	[95.8 - 93.1] 94.6	
Luminal B	460	75	81.9	[85.3 - 77.7] 81.9	
סה"כ	1,714	137			

איור 19 מציג את אותה השוואה עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות גגועות. בשתי הקבוצות הタルים המובאים בין לשיעור-h DRFS בקרבת מטופלות עם גגועות. תת-הסוג B-ו Luminal A-Luminal B.

איור 19: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי עם 3-1 קשריות גגועות



סיכום נתונים עבור איור 19 עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי עם 3-1 קשריות גגועות

קבוצת סיכון	מספר מטופלות	לאורך 10 שנים	מספר אירועים	בטוחו של 10 שנים [95% CI]	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת
Luminal A	375	41	87.6	[90.8 - 83.5] 87.6	
Luminal B	186	52	68.3	[75.0 - 60.4] 68.3	
סה"כ	561	93			

במסד הנתונים המשולב ריק 98 מטופלות שהשתתפו לתת-הסוג הלומינלי עם 4 קשריות גגועות ומעלה. טבלה 21 מציגה את שיעורי-h DRFS-בטווח של עשר שנים עבור מטופלות שהן בעלות סיכון גבוה יותר מאשר בתת-הסוג B-Luminal.

טבלה 21: שיעורי DRFS בטוחו של עשר שנים בקרבת מטופלות בעלות 4 קשריות גגועות ומעלה, עם תת-סוג לומינייל.

קבוצת סיכון	מספר מטופלות	לאורך 10 שנים	מספר אירועים	בטוחו של 10 שנים [95% CI]	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת
Luminal A	62	17	68.3	[79.3 - 53.6] 68.3	
Luminal B	36	20	38.0	[54.5 - 21.4] 38.0	
סה"כ	98	37			

ניתוח הישנות מאוחרת

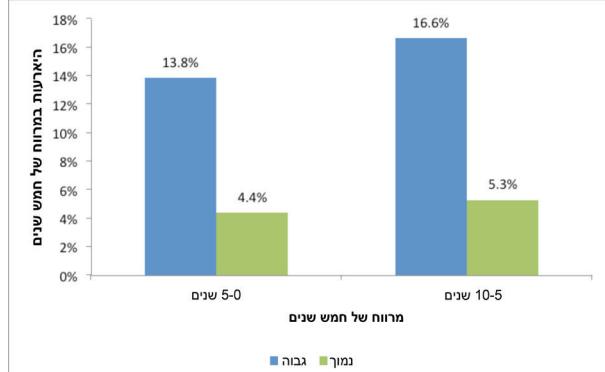
בנתוני הניתוח המשולב שתואר לעיל, שיעורי האירועים בתוך כל קבוצת סיכון אינם קבועים לכל אורך 10 השנים, כפי שנitinן לראות באירועים 16B ו-17B. כדי להבין טוב יותר את ה-DR-בתקופת ההישנות המאוחרת, נרכשה אנליזת פוסט-הוק רטרוספקטיבית של הנתונים המשולבים שתואר לעיל, בקרבת תת-קבוצה של מטופלות שלא חוו הישנות מרוחקת במשך חמישה שנים (סה"כ 2,163 מטופלות⁸). מתוך אלה 1,605, מטופלות היו בעלות מצב קשריות שלילי ו-488 היו בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות גגועות). עברו כל קבוצת קשריות, הערכים שמתוחת לצייר ה-X בשנה 5 באים 20 ו-21 ומציגים את מספר המטופלות לפחות סיכון, הנמצאות בסיכון בטוחו של חמישה שנים, ככלומר זכאיות להיכלל בניתוח ההישנות המאוחרת.

טבלה 22 מספקת סיכום של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים של מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי ומציב קשריות חיובי (3-1 קשריות גגועות) בניתוח ההישנות המאוחרת.

סיכום נתונים עבור איור 17A: לפחות סיכון בקרבת מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות גגועות

קבוצת סיכון	מספר (%)	מספר מטופלות	לאורך 10 שנים	מספר אירועים	בטוחו של 10 שנים [95% CI]	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת
גבוה	(100%) 590	107	(4%) 24	2	[97.8% - 70.6%] 91.7%	
בינוני	(36%) 211	18	(3%) 6	1	[93.9% - 85.2%] 90.4%	
נמוך	(60%) 355	87	(4%) 24	2	[76.6% - 66.3%] 71.8%	
סה"כ	(100%) 590	107	(4%) 24	2	[97.8% - 70.6%] 91.7%	

איור 17B: הראות לפי קבוצת סיכון בקרבת מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות גגועות) במרוחחים של חמישה שנים



באיור 17, לאחר שהרי רק 24 מטופלות עם 2 אירועים בקבוצת הסיכון הנמוך עם מצב קשריות חיובי, מטופלות אלה שולבו עם המטופלות בסיכון בין היתר היחסנות המאוחרת.

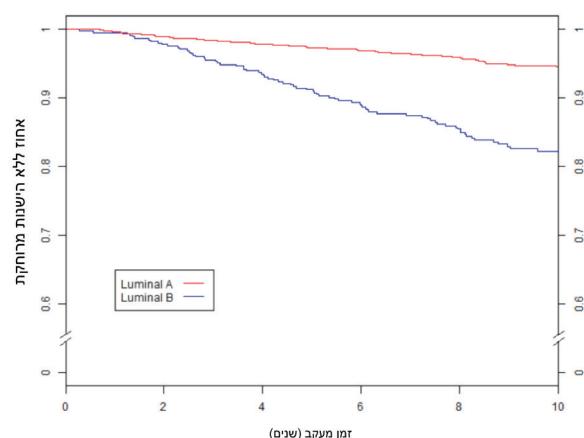
לכ 103 המטופלות במסדר הנתונים המשולב, שהרי בטליה 4 קשריות גגועות ומעלה, מוגנות כבעלות סיכון גבוה. טבלה 20 מציגה את שיעורי-h DRFS-בטווח של עשר שנים עבור מטופלות אלה.

טבלה 20: שיעורי DRFS בטוחו של עשר שנים בקרבת מטופלות עם 4 קשריות גגועות ומעלה

קבוצת סיכון	מספר (%)	מספר מטופלות	לאורך 10 שנים	מספר אירועים	בטוחו של 10 שנים [95% CI]	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת
גבוה	39	103	39	103	[67.0% - 46.3%] 57.4%	

מרבית הבדיקות במחקריהם המשולבים (96%) השתיכו לתת-הסוג A או B-Luminal. איור 18 מציג השוואה של DRFS לפי תת-סוג לומינייל בקרבת מטופלות עם מצב קשריות שלילי.

איור 18: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי.



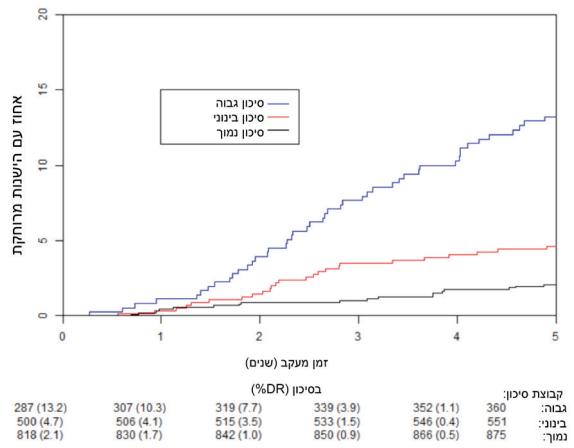
טבלה 25: יחס הטיסICON מרובי המשתנים לשינוי של 10 נקודות בדריג ROR: כל המטופולות בתוך ת-קבוצה לעומת מטופולות בעלות ביוטי שלילי של HER2 בתוך ת-קבוצה

מספר של קשריות נגעות	כל המטופולות [CI 95%]	מטופולות בעלות ביוטי שלילי של HER2 [CI 95%]
מטופולות עם צבע קשריות שלילי	[1.46-1.15] 1.29	[1.54-1.19] 1.35
מטופולות עם צבע קשריות חיובי	[1.53-1.16] 1.34	[1.50-1.11] 1.29

ההשוואה בין קבוצות סיכון מופיעה גם באירועים 20 ו-21, אשר מציגים עוקומות היראוץ להישנות מרוחקת מוקדמת ואחרות שבוגן לי' קבוצות סיכון בקרוב מטופולות עם צבע קשריות שלילי ומצב קשריות חיובי (3-קיוריות), בהתאם. עוקומות היראוץ מטופולות את תקופת ההישנות המוקדמת (ב-5 השנהוות) ואת תקופת ההישנות המאוחרת (בין 5 עד 10 שנים לאחר הדיאגנזה). מתחילה לצייר X מציגים האירועים את מספר הנשים בסיכון ואצל היראוץ המוצברת. טבלאות הטיסICON מציגות את רמות השוכן ערך ממוצע המטופולות הקטן שהשתתך לקבוצת הסיכון "מזרק".

אוכלוסיות הסיכון הנמוך מגלה הסתברות נמוכה להישנות בין השנים 5 ו-10 לאחר 5 שנים טיפול אנדוקריני, כפי שמצוין בעוקומות היראוץ המוצברת וחיסי הטיסICON הקשוריים עבור כל קבוצת סיכון. וביגוד לכך, אוכלוסיות הסיכון הבינווי והגבואה הן בעלות סיכון עזבי להישנות מרוחקת מאוחרת לאחר 5 שנים טיפול אנדוקריני. ההבדל בתוצאות בין אוכלוסיות בעלות סיכון בינווי וגבואה, ומצב קשריות שלילי, מתגלה ב-5 השנהוות [DR = 13.2% – 9.6% = 3.6%] ($P < 0.0001$) וכן נמשך עד לטוחו של 10 שנים; עם זאת, שיעורי ההישנות עבור קבוצת הסיכון הבינווי והגבואה לאחר 5 שנים טיפול אנדוקריני מאוד דומים.

איור A: 20A: עוקומות היראוץ להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בין 5-0 שנים: מטופולות עם מצב קשריות שלילי



סיכון נתונים עבור איור A: 20A: עוקומות היראוץ להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטוחו שניים 5-0 שנים: מטופולות עם מצב קשריות שלילי

מצב DR לפי קבוצת סיכון עד להשלמה של חמיש שנות טיפול [%95% סיכון]		
גובה	בינווי	נמוך
[6.4% - 2.9%] 4.7%	[3.1% - 1.1%] 2.1%	[16.7% - 9.6%] 13.2%

טבלה 22: סיכון של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים עבור ניתוח ההישנות המאוחרת

מאפיין	ערך	מצב קשריות חיובי 3-קיורי (n = 488)		מצב קשריות שלילי (n = 1,605)		מאפיין
		ransATAC (n = 177)	ABCSG8 (n = 311)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 944)	
טיפול	טנטז'זול (Anastrozole)	89	153	346	480	שלב
	טאמוקסיפין (Tamoxifen)	88	158	315	464	
	טוב	36	46	158	192	
	בינוני	105	265	394	752	
גדיל הגידול	ירוד	36	0	109	0	גדיל הגידול
	≥ ס"מ	11	35	116	204	
	2-2 ס"מ	74	165	376	526	
	≤ 3 ס"מ	64	90	139	183	
מצב HER2	< 3 ס"מ	28	21	30	31	סוג ההישנות
	שלילי	157	300	590	888	
	חיובי	20	11	71	56	
	מרוחקת	29	28	40	41	
תת-סוג פנימי NanoString של HER2-Enriched	כל הישנות	37	37	78	71	תת-סוג פנימי NanoString של HER2-Enriched
	Luminal A	112	218	488	674	
	Luminal B	54	87	150	245	
	Basal-Like	1	0	5	4	
	HER2-Enriched	10	6	18	21	

היעד הראשוני היה לאמדוד את היכולת של DRG-ROR לפקק מידע פרוגנומי נסoxic לחישורי היראוץ ללא הישנות מרוחקת (DRFS), הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים בין השנים 5 עד 10. מודול Null שכלל CTS בלבד הושווה למודול חולפי DRG-CTS ו-ROR-DRFS בעדרת מבחן ייחודי (LR). שיעור ה-ROR הוסיף מידע חשוב למשתנים קליניים בבחינה סטטיסטיות לשיעורי ה-DRFS, והוא מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים עבו על המטופולות ($P < 0.0001$), וכן עבו מטופולות עם מצב קשריות שלילי ($P < 0.0001$) ועם מצב קשריות חיובי (3-קיורי) ($P < 0.0001$).

טבלה 23 מציגה סיכון של יחס הטיסICON בשני של 10 נקודות המבוסס על אליזה עם משתנה אחד (univariate) ואניליה מרוחקת-משתנית (multivariate) אשר כוללה הן את דירוג ה-ROR והן את CTS. יחס הטיסICON עבו דירוג ה-ROR-ROS שונים כולם באופן מ-1 גם לאחר התאמת עבו CTS. מדדי C מוצגים גם בטבלה 22. בשתי הקבוצות, מדדי C-הisa שונה באופן אפוא מובהק מהערך חסר המידע של 0.5.

טבלה 23: סיכון של בדיקת הישנות מאוחרת

מספר קשריות נגעות	N	יחס סיכון:		
		שיעור סיכון: שינוי של 10 נקודות בדריג ROR	מדד-C עם 95% רוח בר-סמן	מדד-C עם 95% רוח בר-סמן
אליזה בעלת משתנה אחד	1,605	75.5%	64.7%	70.1%
אליזה בעלת משתנה אחד	488	78.3%	64.0%	71.1%

הריבית המטופולות בשני המקרים היו בעלות ביוטי שלילי של HER2. בטבלה 24 מציג את ההסתפלות של מצב HER2 בקרוב המטופולות בעלות מצב קשריות שלילי ומצב קשריות חיובי (3-קיוריות). בשתי הקבוצות, מעל ל-90% מהנשים במחקריהם היו בעלות ביוטי שלילי של HER2.

טבלה 24: התפלגות של מצב HER2 לפי מספר הקשריות הנגעות

תקבוצה של מטופולות	מדד- <i>C</i>	מצב קשריות	
		שלילי	חיובי
מטופולות עם מצב קשריות שלילי	1,605	127 (7.9%)	1,478 (92.1%)
מטופולות עם מצב קשריות חיובי	488	31 (6.4%)	457 (93.6%)

טבלה 25 מציגה השוואה בין המודול המותאם לכל המטופולות לבין קבוצת קבוצה ננתונה בין המודול המותאם לכל המטופולות בעלות ביוטי שלילי של HER2 לבין קבוצת קבוצה. אין הבדלים מובהקים בבחינה סטטיסטיות.

סיכום נתונים עבור אירט 21B: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשיות חיבוי (1-3 קשיות)

שיעור DR לפי קבוצת סיכון חמוץ שניהם לאחר הטיפול ללא הישנות מרחוקת	
[רמת מסך של 95%]	
גובה	גבוה
מספר / בימי	[21.3% - 11.7%] 16.6%
[8.4% - 2.0%] 5.3%	

מסקנות הניתוח המשולב

הוכח כי ציון ROR מוסף מידע פרוגנומי שימושי בתקופת הרישנות המאוחרת בין 5-10 שנים לאחר האבחון ומצלם לשנתנים קליניים סטנדרטיים במחקר המשולב עבור חולמים שהו ללא הישנות מרחוק עד חמיש שנים. באמצעות קבוצות סיכון המוגדרות בرمת הבסיס עבר כל אחד מהקהוטרים בעלי הספירה הספציפית של הקשיות, וכך כי קבוצות הסיכון מחלקות את כל המטופלות לקבוצות בעלות סיכון שונה באוון מובהק להישנות מרחוקת מוחדרת. הן הניתוח הראשי והן הניתוח של קבוצות המבוססות על דירוג ROR הבול למידע פרוגנומי דומה בתת-קבוצות שונות. לא התגלו הבדלים מהותיים בין התוצאות המבוססות על מטופלות בעלות ביוטי שליל' של HER2 לבן אלה המבוססות על כל המטופלות.

במחקר TransATAC TransATAC ABCSG-8 ומחקר ROR-ABC GCSG-8, הוכח כי ה-ROR מוסף מידע מובהק הרבה מעבר לשנתנים הקליניים והטיפוליים הסטנדרטיים, הן כשהוא כלל כמדד רצוף וכן כשהוא נכלל בעדרת שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. לשני המחקרים היו פרופולי סיכון שונים אשר שיעור האירועים היגובה יותר במחקר TransATAC מאשר במחקר ABCSG-8: ABCSG-8: ניתן לראות זאת בברור בעת השוואת DRFS (%) (DRFS-ABC) (90.8%) ATAC (90.8%) ABCSG-8 (92.5%) שעילו דוח בספרות¹⁰. ניתוח זה שליבר בין הנתונים ממשין המהקרים, כאשר לכל אחד מהם ניתן משקל זהה, כדי ליצור פרופולי סיכון שייהו ניתנים יותר להכללה עבור או כל סיבות אחרות של מטופלות מאשר תוצאות מוחדרקים הבזודים.

מחקר 1: חיזוי הסיכון להישנות מרחוקת נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם, בעל גידולי קולtan הורמן חיבוי ומצב קשיות שלילי או חיובי, המטופלות באירועים או בטמוקסיפין: מחקר TransATAC

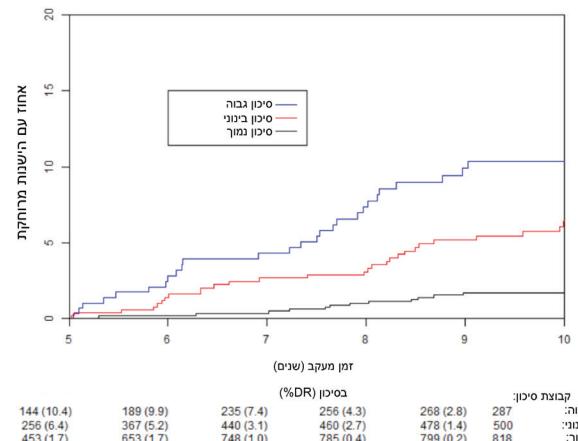
תכנון המבחן

מחקר התקionario הקליני נועד לאמת כי דירוג הסיכון להישנות המחללה (ROR) מספק מידע פרוגנומי נוסף עבור שיעורי הירשות להישנות מרחוקת (DRFS). הרבה מעבר לשנתנים קליניים סטנדרטיים, תוך שימוש בכל דגימות המטופלות הזמינים. מחקר זה השתמש ב-RNA שעבר הליך ביידוד מركמת גודל סרטן השד שקובעה בפורמיין וונשמרה בתרף פרפין (FFPE), מתת-קבוצה של המטופלות שהשתתפה בניסוי ATAC¹¹. שבחן המטופלות עברו ניסוי ATAC כל 9,366 מטופלות בשולש דרישות ניסוי (1:1:1), שבחן המטופלות עברו רדומיזציה לצורכי קבלת טיפול אנדוקריני במשך 5 שנים של מ"ג אחד של אנטסרוזול (כלומר ארימידזוק) בנוסף לפילצובו של נטומקסיפין, 20 מ"ג של טומוקסיפין/ארימידזוק. קבוצת הטיפול המשולב הופסקה לאחר אנטסרוזול, או שילוב של טומוקסיפין/ארימידזוק. ניתוח התוצאות ייעילות או עמידות על פני הניתוח הריאוני ממשם שהתגלה כי אין לה יתרונות מחייבים ייעילות או עמידות על טיפול בטמוקסיפין בלבד. לאחרונה, דוחו כי מעקב חיצוני של 10 שנים של דרישות הטיפול היחידי ניסוי ATAC עמדzo בדרישות-h FDA מבנית מידע מעודכן של בטיחות ויעילות⁹. עבור מטופלות בעלות גידולי קולtan הורמן חיבוי, היה שיפור מובהק מבחינת HR (DFS HR = 0.86 (= 0.86 DRFS) RFS = 0.79) (HR = 0.85) באנטסרוזול בהשוואה לטמוקסיפין בניתוח זה. ההבדלים האבסולוטיים בשיעור ההישנות לא הושנו מרחוקת בין אנטסרוזול לטמוקסיפן הלו וגלו לארוך זמן- 2.7% לארוך 5 שנים- 4.3%- 4.3% בטוחה של 10 שנים. פרויקט TA/01, במטרה להקם בנק רקמות מבלוקים היסטופתולוגיים ארכיאוניים של פרפין (FFPE) מטופלות ATAC בקרה וטרוספקטיבית¹¹.

בסך הכל הושגו 2,006 בלוקים-מ-4,160 נשים עם סרטן שד בעל גידולי קולtan הורמן חיובי, אשר עברו רדומיזציה במסגרת דרישות הטיפול היחיד של ניסוי ATAC. מתוך אותן בלוקים, FFPE 1,372 ואספו מטופלות בריטניה והכליל גידולים פולשניים מספיק לצורך Oncotype Dx¹² Genomic Health[®] Oncotype Dx[®] Recurrence Score[®] (RS) (RS) נקבע באירועים בולוק-ה-FFPE. רדומיזציה ב-ATAC¹¹, ווואזות המבחן ספקו תוקף קליני-ל-RS לצורך הערכת שיעור ההירשות לא הישנות מרחוקת בקרב מטופלות לאחר גיל המעבר עם סרטן שד בעל גידולי קולtan הורמן חיובי, המטופלות אנטסרוזול או בטמוקסיפין. ה-RNA הננותר מחקר Oncotype Dx[®] נשלח לבתי החולים Royal Marsden Hospital בלונדון, שם ואוחסן בטמפרטורה של 70°-70° C. מטופלות בסך הכל ממחקר Oncotype Dx[®] נשארו מעל 500 נ"ג של RNA, והן נבדקו על-ידי NanoString נחלק ממחקר התקionario הקליני של NanoString¹³.

במחקר זה נעשה שימוש בתת-הסוגים הפנימיים שספקה הבדיקה, והואבחן שתי גרסאות של דירוג ROR-ה-ROR, כל אחד מהם בטוחה של 0-100, וחושבו באמצעות גישה סדרתית מוגדרת מראש. שני הדירוגים השונים של שפורסום עבור² או באמצעות תת-קבוצה של 46 גנים. בכל אחד מההקרים, המקדים חושבו ממודול קווקס הכלול את מתאם פירסון עבור 50 או 46 הגנים לצורכי חישוב כל תת-וגן פנימי, שיעור התוצאות וגודל גידול. כל הניתוחים בוצעו בונומי מעקב של 10 שנים.

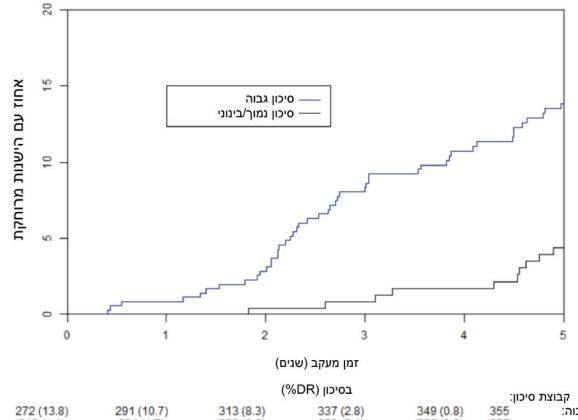
אייר 20B: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשיות שלילי



סיכום נתונים עבור אירט 20B: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשיות שלילי

שיעור DR לפי קבוצת סיכון חמוץ שניהם לאחר הטיפול ללא הישנות מרחוקת	
[רמת מסך של 95%]	
גובה	גבוה
מספר / בימי	[8.7% - 4.1%] 6.4%
[2.6% - 0.8%] 1.7%	[14% - 6.6%] 10.4%

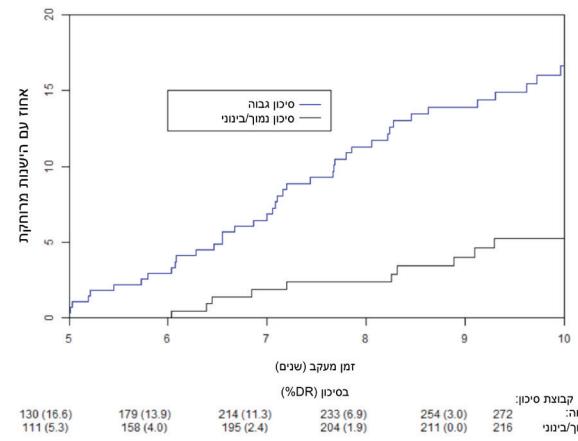
אייר 21A: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשיות חיובי (3-1 קשיות)



סיכום נתונים עבור אירט 21A: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשיות חיובי (3-1 קשיות)

מצב DR לפי קבוצת סיכון עד חמיש שנות טיפול	
[רמת מסך של 95%]	
גובה	גבוה
מספר / בימי	[17.4% - 10.1%] 13.8%
[7.0% - 1.7%] 4.4%	[17.4% - 10.1%] 13.8%

אייר 21B: עיקומות היארעות להישנות מרחוקת לפי קבוצת סיכון בטוחה שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשיות חיובי (3-1 קשיות)



תוצאות

הבדיקות של הבינוח הריאשי הראו כי דירוג ה-ROR מספק מידע פרוגנוטי נוסף בעבור השער ההישרדות ללא הישנות מרחוקת הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים (CTS). כל נתוני ה-ROR המדודים שלhalten מובססים על 46 גנים, והויל זהה הבסיסי ROR-can כדי שוויה בבדיקה של Prosigna.

טבלה 28: בדיקות ניתוח ראשי של ROR

χ^2	p-value	$\Delta LR \chi^2$	מודל חלופי	מודל Null
P < 0.0001		34.21	CTS + ROR	CTS

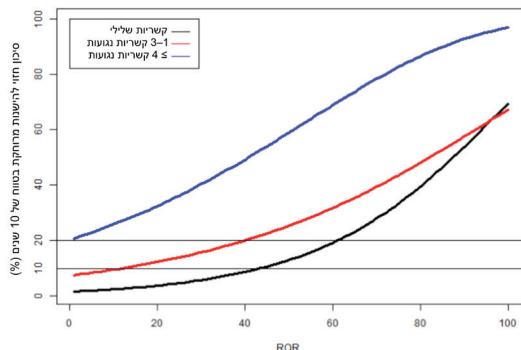
ניתוח נתוניים מנשיים הראו כי יש קשר מובהק בין ROR לשיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת, וכי הוא מוסיף מידע פרוגנוטי מעבר ל-CTS בתת-קבוצות רבות בעלות רלוונטיות קליניות.

טבלה 29: חזרה על בדיקות ניתוח ראשי עבור תת-קבוצות מוגדרות מראש

CTS Mol CTS+ROR	מספר איזומרים	מספר מטופליות	נקודות קצה	קבוצת נבדקה
χ^2	$\Delta LR \chi^2$			
0.0001 >	34.2	160	1007	DRFS
0.0001 >	31.2	210	1007	RFS
0.0001 >	28.9	131	888	DRFS
0.0001 >	26.9	179	888	RFS
0.0001 >	25.0	79	739	DRFS
0.0001 >	21.5	117	739	RFS
0.0023	9.3	81	268	DRFS
0.0011	10.6	93	268	RFS
0.0001 >	24.6	62	649	DRFS
	> 0.0001	20.8	98	RFS
			649	וביוטי של HER2

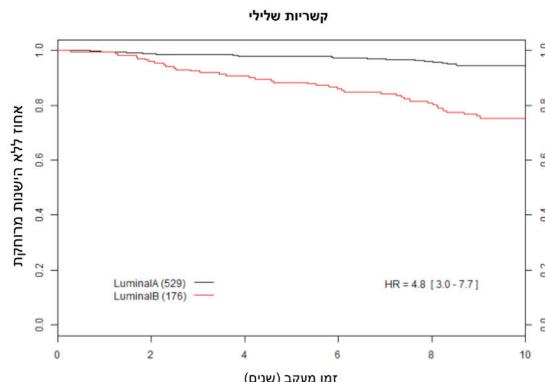
ניתוח נתוניים ראשיים ומושנים הוכיחו כי קיים קשר רצוף בין ROR ל-DRFS בכל המטופליות ובכל מת הקבוצות.

איור 22: הערכה של סיכון חזוי להישנות מרחוקת לאחר עשר שנים לפי ניתוח של דירוג ROR בקבוצות של מצב קשורות



ניתוח נתוניים מנשיים מראים כי מתחת הסוגים A ו-B Luminal הינו תוצאות שונות באופן מובהק מבחן סטטיסטי בסוגת כל תת-קבוצה של מטופליות המוגדרת לפי מצב הקשורות.

איור 23: עקומות KM (Kaplan-Meier) לשיעור DRFS (Kaplan-Meier) עבור מטופליות בעלות מצב קשורות Shallow לפי תת-סוג פנימי



נקודות הסימן הראשית הייתה שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS). שימוש זה הוגדר בתור מרוחק הזמן המבחן ועד לשיעור ההישרדות או למועד כהוצאה מסרטן החדש. נקודת הסימן המשנית הייתה שיעור ההישרדות ללא הישנות (RFS). שימוש זה הוגדר בתור מרוחק הזמן מהבחן ועד להישנות הראשונה (מקומית, אזורית או מרוחקת) או למועד כהוצאה מסרטן החדש.

במציאות כל דגימות המטופליות הזרמיות, הוכנו מודלים מושבי משתנים של סיכון פרופורציוני (PH) מושג קווקס כדי להעיר את היעד הראשוני בבדיקה סדרתיות של ROR בתהbbox 50-46 ג'ים. המודול כלל את המשתנים המתואימים הקליניים הטסטנדרטיים (גיל, גודל הגוף, גודל הגידול, מצב הקשורות, טיפול מושבם (אגדובטני)). לאחר מכן נוצר מודול קווקס ונעשה שימוש בבדיקה יחס כפוף בעקבות סטטיסטיות ($\chi^2 = 0.05$) הרבה מעבר לכלול הוסף מידע פרוגנוטי נוסף בעקבות סטטיסטיות (CTS). דירוג ה-ROR הוא שילוב ממושבם של גורמים קליניים-פטולוגיים שפותחו על ידי החוקר הקליני למדידת פטולוגיה סטנדרטית.¹² ניתוח הנתוניים הראשיים בוצע שוב עבור תת-קבוצות שונות של מטופליות (כולל, מצב קשורות Shallow, HER2 או RFS).

בעור כל אחת המטופליות בעלות מצב קשורות Shallow או חיובי, נעשה שימוש במודול קווקס (פרט ל-DR) כדי לחזות את סיכון בטעו של 10 שנים כפונקציה של מידת הסיכון להישנות המחלת (ROR). בהתקבב על תוצאות אלה של המודלים, הוגדר שלוש קבוצות סיכון בזורה הבא:

- סיכון נמוך: פחות מ-10% סיכון ל-DR בטוחו של 10 שנים
- סיכון בינוני: 10-20% סיכון ל-DR בטוחו של 10 שנים
- סיכון גבוה: יותר מ-20% סיכון ל-DR בטוחו של 10 שנים

ניתוח

אומדי Kaplan-Meier (KM) נוצרו עבור כל קבוצת סיכון. בדיקות יחס ניראות המשמשות להשוואה התחילה של שני מודלים סטטיסטיים, ממטורן בניתוח הראשוני, בוצעו עבור בדיקת Ax Dx של Genomic Health Oncotype (GHO). תוצאות אלה הושוו לתוצאות שהושגו עבור המבוססת על אימונוהיסטוכימיה (IHC4). תוצאות אלה הושוו לשיעור הרבה מעבר ROR לקביעת המידה שהיא כל מערכת דירוג מספקת מידע פרוגנוטי נוסף DRFS-CTS. לא יתבצע דין נוסף ב庆幸ות של IHC4 הוביל וקשה להשוות אותן בבדיקות TransATAC אחרות ממש שבדיקת IHC4 בוצעה באמצעות נתוני מחקר מתקדם.

טבלה 26: סיכון נתוניים דמוגרפיים ומאפיינים קליניים

מאפיין	מבחן קשורות		מחקר נכחי (n = 1,007)	
	אחוז מטופליות	מספר מטופליות	התקבל RNA (n = 1,231)	מחקר נכחי (n = 2,929)
שallow	68%	71%	70%	701
חובי	25%	25%	27%	268
לא ייחודי	7%	4%	4%	38
גודל הגוף	70%	67%	14% 52%	138 523
שלב הגידול	30%	33%	25% 9%	253 93
גיל	25%	27%	21%	213
מין	59%	57%	60%	601
ירוד	17%	16%	19%	193
ממוצע	66.1	64.3	64.4	

טבלה 27: מאפיינים קליניים נוספים

תת-סוג	מאפיין	מספר מטופליות	אחוז מטופליות
Basal-Like	1%	9	1%
HER2-Enriched	4%	41	4%
Luminal A	69%	692	69%
Luminal B	26%	265	26%
אנטרכוזול	51%	513	51%
טומוקרייפט	49%	494	49%
סוגי היסנות	21%	210	21%
מורוקת	16%	160	16%
מצב HER2	88%	888	88%
שallow	12%	119	12%
חיובי			

סיכום נתונים עבור אירור DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופולות עם 3-קיירות חיובית
ללא CTS

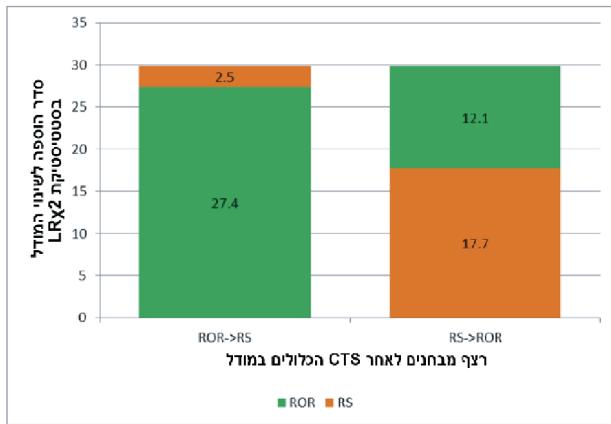
קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים	אחוז משוער לאוישנות מוחקת בתוך של 10 שנים [95% CI]
נכוע	(3%) 6	0	[לא זמן] 100%
בינוי	(35%) 74	11	[93% - 76%] 84%
גבוה	(63%) 134	38	[77% - 59%] 68%
סה"כ	(100%) 214	49	

השוואה של RS עם ROR

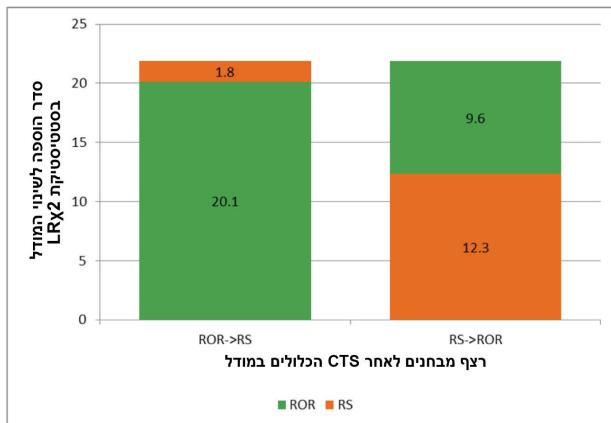
מתוך 1,007 הדוגמאות עם דירוג ROR, תוצאות בדיקת Dx Oncotype CX היו זמיןות עבור כל 1,007 הדוגמאות, אך תוצאות CX היו זמיןות רק עבור 940 דוגמאות. כדי לאפשר השוואת כל שלוש הבדיקות, התוצאות בסעיף זה מבוססות על 940 הדוגמאות שהיו להן תוצאות בדיקות עבור כל שלוש השיטות (עם זאת, לא נכלל כאן איזון על IH/C4). בדיקות יחס הנינראות מזeggות לצורכי הוספה משתנה בודד, וכן כדי שмыידע הנוסף תהיה מובהקות סטטיסטיות ($P = 0.05$), השימוש בתוצאות הסטטיסטיות של דרגת חופש את χ^2 חיבר להיות גדול מ-3.84. האירומים הבאים מציגים את המדיע שנוסף בעת הוספה הבדיקה הפרוגנוטית לבדיקה פרוגנוטית אחרת בנוסף ל-CTS ברכז. בכל אחת מההתוספות, המדיע שנוסף נמדד לפי השמי χ^2 .

RS שנוסף ל-RS בנוסח-CTS: מידע פרוגנוטי

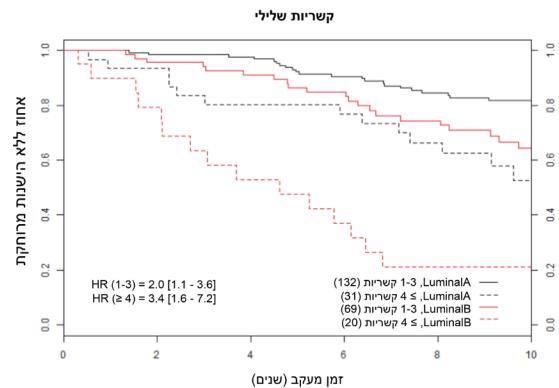
איור 27: מידע פרוגנוטי לשיעור DRFS מעבר-ל-CTS בקצב כל המטופלות (n = 940)



איור 28: מידע פרוגנוטי לשיעור DRFS מעבר-ל-CTS בקצב מטופולות בעלות מצב קשיות שלילי (n = 683)

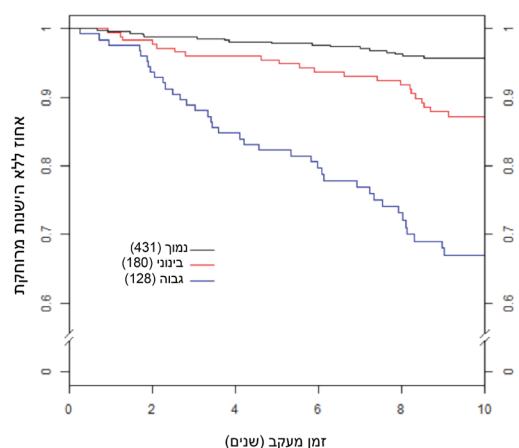


איור 24: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS עבור מטופולות בעלות מצב קשיות חיובי
לפי תת-סוג פנימי



איורים 25 ו-26 מראים שבמסגרת כל קטגוריה של קשיות, הסיכון הקליני המוחלט של אותן מטופולות, בשילוב תוצאות של סיכון נמוך היה שווה באופן מוחשי מהיסיכון הקליני המוחלט של המטופולות בעלות התוצאות של סיכון: המטופולות בעלות התוצאות של הסיכון הנמוך הציגו שיעורי DR בטוחו של 10 שנים לפחות מ-10%, ואילו המטופולות בעלות התוצאות של הסיכון הגבוה הציגו שיעורי DR בטוחו של 10 שנים לפחות מ-30%.

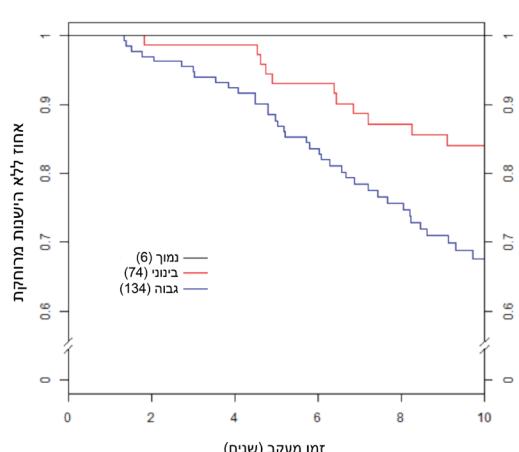
איור 25: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופולות עם מצב קשיות שלילי ללא CTS



סיכום נתונים עבור אירור DRFS 25 לפי קבוצת סיכון בקרב מטופולות עם מצב קשיות שלילי
ללא CTS

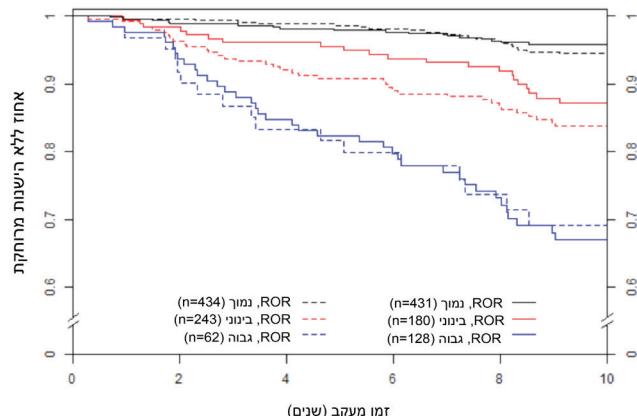
קבוצת סיכון	מספר מטופולות (%)	מספר אירועים	אחוז משוער לאוישנות מוחקת בתוך של 10 שנים [95% CI]
נמוך	431 (58%)	17	[98% - 94%] 96%
בינוי	180 (24%)	22	[92% - 81%] 86%
גובה	128 (17%)	38	[76% - 59%] 67%
סה"כ	739 (100%)	77	

איור 26: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופולות עם 3-קיירות חיובית ללא CTS



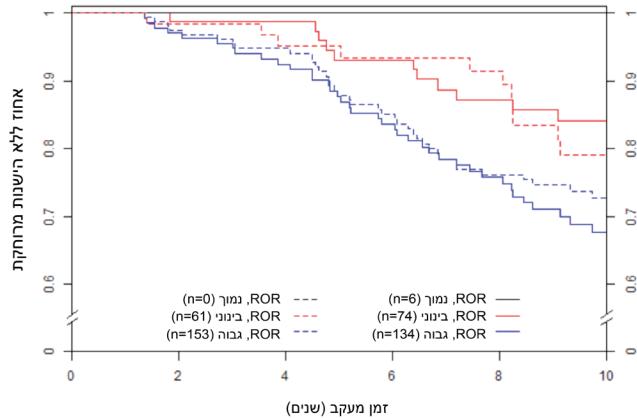
החוקרים הבלטי התייחסים של המחבר TransATAC למסקנה Prosigna-sh-ROR הקצתה פחות מטופולות לקבוצת חסיכון הבינוני לעומת RS של Oncotype DX, עם הפרדה שווה או גבוהה יותר בין קבוצות חסיכון הנמוך והגבוה.

איור 31: דירוג RS של ROR ב-*TransATAC*, באופן ניכר, מספר רב יותר של מטופולות השicasיות לקבוצת חסיכון הגבוה, ומספר קטן יותר של מטופולות השicasיות לקבוצת חסיכון הנמוך לעומת RS של Oncotype DX בעבור מטופולות עם מצב קשיוטית שלילית.



כasher נעשה שימוש אך ורק בדירוג ROR בקשר למטופולות עם 3-1 קשיוטיות נגעות, נמצא 6 מטופולות אשר נובא להן חסיכון > 10% להישנות מרוחקת. אף אחת מהמטופולות הללו לא צוו אירועים במהלך המבחן. אחת מהמטופולות הללו נצפתה במשך 7.9 שנים וכל האחרות לא צוו DR במשך 9.9 שנים של מעקב, מה שמעיד על כך שהמטופולות בעלות מצב קשיוטיות חיובי, אשר נובא להן חסיכון נמוך, היו אכן בעלות חסיכון נמוך. לא נעשה שימוש במבחן דירוג לוג (log-rank) להשוואה, מאחר שלא הייתה קבוצת חסיכון נמוך בעור RS.

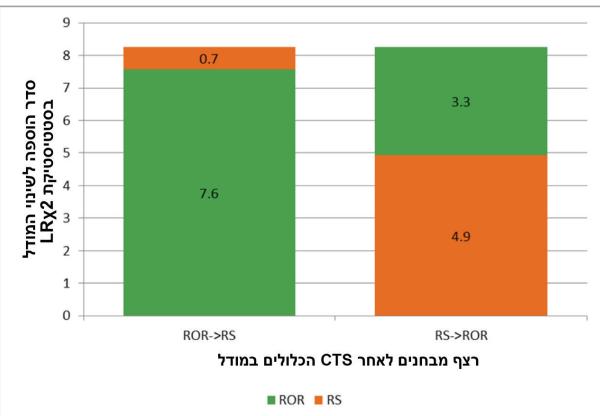
איור 32: השוואת סיווג קבוצות חסיכון ל-DRFS בטוחו של 10 שנים מבלי להשתמש ב-*CTS*: מטופולות בעלות מצב קשיוטיות חיובי (3-1 קשיוטיות ROR) לעומת RS.



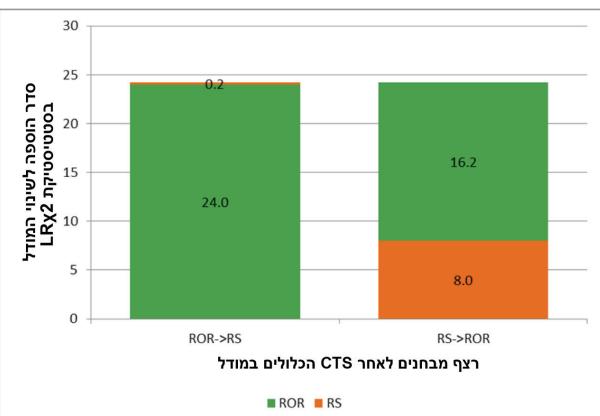
מסקנות של מחקר קליני 1

הניתוח הראשי גילה כי שייעור-h-ROR הוא סוף מידע פרוגנוטי מובהק מעבר למידע שספקים המשתאים המתואימים הקליניים הסטנדרטים (CTS) בקשר כל המטופולות, ובכלל ROR-ה-תסת-קבוצות הרלוונטיות מבחינה קלינית, אשר הוגדרו מראש. המחקר גילה כי ה-ROR מחלק את המטופולות ל-3-תסת-קבוצות סיכון, המיניבות תוצאות שונות מובהקות מבחינה סטטיסטיות בקשר למטופולות בעלות מצב קשיוטיות שלילי. הממצאים הראו כי התסת-סוגים סיכון הכוון מטופולות בעלות אותו סיכון, כדי להשיג קבוצות סיכון יתונות להשוואה, מקודמות הסוף אשר שימושו את המבחן Oncotype DX הוא שנות מהנדדור אשר שימושו את Genomic Health. עברו כל בדיקה, קבוצת חסיכון הנמוך הוגדרה באופן פרוספקטיבי, מטופולות בעלות סיכון משוער כ-0% - 10% להישנות הממליה. עברו כל בדיקה, קבוצת הסיכון הבינוי הוגדרה באופן פרוספקטיבי, מטופולות בעלות סיכון משוער הנע בין 10% - 20% להישנות הממליה. עברו כל בדיקה, קבוצת חסיכון הגבוה הוגדרה באופן פרוספקטיבי מטופולות בעלות סיכון משוער גדול מ-20% להישנות הממליה. האיור להלן מוסכם את הגודלים ואת התוצאות של קבוצות חסיכון שהוגדרו על-ידי כל אחת מהבדיקות.

איור 29: מידע פרוגנוטי לשיעור DRFS מעבר ל-*CTS* בקשר למטופולות בעלות מצב קשיוטיות (n = 257)



איור 30: מידע פרוגנוטי לשיעור DRFS מעבר ל-*CTS* בקשר למטופולות בעלות מצב קשיוטיות שלילי וBitteי שלילי של HER2 (n = 649)



איורים 27 עד 30 מציגים את המידע שנוסף מעבר ל-*CTS* כאשר שתי הבדיקות הprogנוטיות נוספות בוצו. בכלל אותן מתוצאות המידע שנוסף נמדד לפי השינוי בתוון הסטטיסטי χ^2 . לדוגמה, כאשר ROR בבדיקה הראשונה שנוסף לאחר הבדיקה CTS (כל תוני המטופולות), השינוי בתוון הסטטיסטי χ^2 היה 27.4. עם ROR ו-*CTS* במודול, הוספה RS הביאה לשינוי בתוון הסטטיסטי χ^2 של 2.5, שאינו שינוי מובהק (הערך הקритרי עבור בדיקת χ^2 עם דרגת חופש אחת הוא 3.84). לעומת זאת, כאשר ROR ו-*CTS* נמצאים במודול RS, אין מושיף מידע בעל מובהקות. עם זאת, כאשר RS הינה הבדיקה הראשונה שנוספה, עדיין היה מידע כולל ב-*CTS* ו-*RS*. שתי הבדיקות שנוספה, על-לאן נשללו בשלב של *CTS* ו-*RS*. שתי הבדיקות היזגו מובהקות פרגנוטיטי כשותפו-*CTS* ו-*RS*. שום שינוי מובהק בשילוי מטופולות בעלות מצב קשיוטיות חיובי, אך אף אחת מהבדיקות לא הצליחה מובהקת ב证实 המבחן יouter. עברו תות הקבוצה של מטופולות בעלות מצב קשיוטיות שלילי וBitteי שלילי של HER2, RS, או מושיף מידע פרוגנוטיטי מובהק-*CTS* + ROR. מצד שני, *CTS* + ROR מוסיף מידע פרוגנוטיטי מובהק-*CTS* + RS.

ROR מול RS: תוצאות של קבוצות סיכון

על מנת להשוות כיצד שתי הבדיקות הפורידו בין המטופולות בהתאם לשיכון, הוגדרו קבוצות סיכון בהבוסס על הערכת חסיכון של כל אחת מהבדיקות להישנות מרוחקת בתוון של 10 שנים באוכולוסיטי-*CTS*. *TransATAC* בקשר חסיכון להגדלת קבוצות סיכון בהחזרה בהבוסס על התוצאות של בדיקת חסיכון. כדי להציג קבוצות סיכון יתונות להשוואה, סיכון הכוון מטופולות בעלות אותו סיכון, כדי להציג קבוצות סיכון יתונות להשוואה, מקודמות הסוף אשר שימושו את המבחן Oncotype DX הוא שנות מהנדדור אשר שימושו את Genomic Health. עברו כל בדיקה, קבוצת חסיכון הנמוך הוגדרה באופן פרוספקטיבי, מטופולות בעלות סיכון משוער כ-0% - 10% להישנות הממליה. עברו כל בדיקה, קבוצת הסיכון הבינוי הוגדרה באופן פרוספקטיבי, מטופולות בעלות סיכון משוער הנע בין 10% - 20% להישנות הממליה. עברו כל בדיקה, קבוצת חסיכון הגבוה הוגדרה באופן פרוספקטיבי מטופולות בעלות סיכון משוער גדול מ-20% להישנות הממליה. האיור להלן מסכם את הגודלים ואת התוצאות של קבוצות חסיכון שהוגדרו על-ידי כל אחת מהבדיקות.

איור 31 מציג את התוצאות לפיה Prosigna-sh-ROR הקצתה מטופולות שפחות מאשר של 26% לעומת RS של Oncotype DX (180) מטופולות לעומת 243 מטופולות). קבוצת חסיכון הבינוי לעומת RS של Oncotype DX יוצרת מטופולות לקבוצת חסיכון הגבוה לעומת RS של Oncotype DX. כמו כן, Prosigna-sh-ROR הקצתה מטופולות שפחות מאשר של 26% מטופולות בעלות סיכון הגבוה לעומת RS של Oncotype DX. עם זאת, קבוצת חסיכון הנמוך והחסיכון הגבוה שהוגדרו על-ידי כל אחת מהבדיקות גילוי תוצאות דומות, כמתואר בעקבות KM (Kaplan-Meier) החופפות. נמצא זה הוביל את

באמצעות כל דגימות המטפולות הזרמיות, הוכנו מודלים מרובי משתנים של סיכון פרופורציאני (PH) מסווג קוקס כדי להעיר את היעד הראשוני בבדיקות סדרתיות של ROR, ROR, מילוט בקטגוריות סיכון מובוסות ROR שהוגדרו מראש. המודלים כללו את המשתנים המתואימים הקליניים הסטנדרטיים הקטגוריאליים (עם ערכיהם אפשריים):

- גיל (≤ 65) או (> 65)
- שלב G1) או X (G2/GX)
- גודל גידול כולל (T2/T3, T1, N+, (1-3), N+, (4), (≥ 4))
- מצב קשיות (N0, N+, (1-3), N+, (4))
- טיפול משלים (אדג'ובטן) (טומוקסיפן) (Tamoxifen) בלבד, או טומוקסיפן (Anastrozole) ← (Tamoxifen)

כאשר N0 מציין מטופלות בעלות מצב קשיות שלילי, ו-N+(1-3) מציין מטופלות עם מצב קשיות חיובי עם 3-1 קשיות נגעות, ו-(4) (≥ 4) מציין מטופלות עם מצב קשיות חיובי עם 4 קשיות נגעות ומעלה. T1 מציין גידול שగודל הכלול ≤ 2 ס"מ, T2 מציין גידול שగודל הכלול עליה ≤ 2 ס"מ אך אין עליה על 5 ס"מ, ו-T3 מציין גידול שגודלו הכלול עליה על 5 ס"מ. המחקר כלל 14 דגימות משלב T3 בלבד, لكن הן שילבו עם הדגימות שלב T2. נערה השואה בין הגידולים הממוניים היבר (G1) לשילוב של גידולים ממוניים בשורה (G2) וגידולים לובירליים משלב GX. גידולים לובירליים משלב GX טופלו כגידולי G2 לשם הניתן משלב G2 הוא השלב השכיח ביותר בקרב אוכלוסיית המטופלות לשימוש המועד.

המשתנים המתואימים והזנו במודל לצורה של 'דיג'וג טיפול קליני' (CTS). כדי להציג דירוג המשתנים המתואימים, הזנו במודל לצורה של 'דיג'וג טיפול קליני' (CTS, CTS).

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

כאשר סימוני ה-z מייצגים את המשתנים הקליניים והטיפולים המופיעים לעיל ו-H ו-CTS הוגדר באמצעות הערכות של סימוני ה-z שהושגו לעיל; כלומר, $\sum_j z_j = CTS$.

הנתה הטיסון הפרופורציאני נבחנה באמצעות שARIOT Schoenfeld. המטופלות שנכללו במחקר התקיוף גילו מאפיינים דומים לאלה שנכללו במחקר ACB-8 המ对照.

טבלה 30: סיכון של מאפיינים קליניים

סה"כ (n = 3,714)		לא כלול (n = 2,236)		כלול (n = 1,478)		עריך	מאפיין
%	#	%	#	%	#		
49.8%	1,849	49.3%	1,108	50.1%	741	(Tamoxifen) בלבד טומוקסיפן (Anastrozole)	טיפול
50.2%	1,865	50.2%	1,128	49.9%	737		
1.2%	46	1.4%	32	0.9%	14	шибלי חיבוי לא דיעו	מצבי ER
98.6%	3,663	98.3%	2,199	99.1%	1,464		
0.1%	5	0.2%	5	0.0%	0	G1 G2 GX	שלב
19.9%	739	20.8%	468	18.3%	271		
75.7%	2,811	73.9%	1,659	77.9%	1,152	N0 N+(1-3) N+(4)	մԵկ հարցություն
4.4%	164	4.9%	109	3.7%	55		
74.6%	2,770	76.7%	1,723	70.8%	1,047	G1 G2 GX	PgR
22.4%	831	20.0%	449	25.8%	382		
3.0%	113	2.8%	64	3.3%	49	PgR לא דיעו	שלב הגידול
18.4%	684	18.9%	424	17.6%	260		
81.4%	3,023	80.4%	1,805	82.4%	1,218	T1 T2 T3	גיל
0.2%	7	0.3%	7	0.0%	0		
74.9%	2,782	77.7%	1,745	70.2%	1,037	חיצוני טוווע	64 80- 41
24.2%	899	21.0%	472	28.9%	427		
0.9%	33	0.8%	19	0.9%	14	לא רלוונטי	63 79-41

* כולל מטופלת אחת עם < 9 קשיות נגעות

טבלה 31: מאפיינים קליניים נוספים

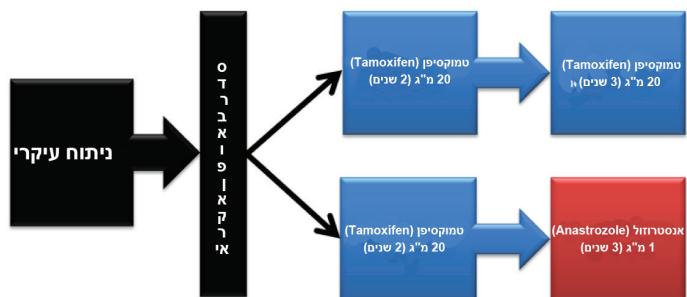
אחד מטופולות	מספר מטופולות	עריך	מאפיין
67.9%	1,004	LuminalA	תת-סוג פנימי
28.3%	418	LuminalB	
3.2%	48	HER2-Enriched	
0.5%	8	BasalLike	
10.5%	155	מוהקת	סוג היישנות
13.1%	194	כל היישנות	
94.5%	1,397	шибלי	
5.2%	77	חיבוי	
0.3%	4	לא דיעו	מצב HER2

מחקר 2: פרוגנוזה לנשים לאחר גיל המעבר עם סרטן השד, בעלות גידולי קולtan המרzon חיובי (HR+), המקבלות טיפול אנדוקריני משלים (אדג'ובטן) מערכת בלבד, באטען הבדיקה של prosigna: מחקר ABCSG-8

תכנון המחקר

קוורטט המחקר מכיל 2,901 נשים של סרטן שגודל מטרופוליט שונרשו (FFPE) שנאספו בעבר ואוחסנו בארכון במאגר הגידולים ABCSG מטופוליט שונרשו בין השנים 1996-2004 ונ-HR+, חוליקו אקדמי לפני טיפולם. קבוצה אחת קיבלה טיפול שד בשלב מוקדם (Tamoxifen), מילוט בשלוש שנות טיפול בטומוקסיפן (Tamoxifen) בלבד, או לטומוקסיפן (Arimidex) (Anastrozole) וקבוצה אחרת קיבלה חמש שנות טיפול בטומוקסיפן (Tamoxifen). מבנה הטיפול של הניסוי מוצג באIOR 33.

AIOR 33: סכימה של תכנון המחקר ABCSG-8



קוורטט המתקיוף מייצג חלק מקוורטט ABCSG שברארקון, אשר עברו בין הינה היא לאספונטן דגימות רקמה מאגר הגידולים ABCSG שברארקון, או שהו עבורי ניתן לקבל הסכמה מדעת, או שהמטופולט נפטרה. מטופולות שעמדו בקריטריונים להשתתפות במחקר המתקיוף הוציאו מהמחקר רק אם הרקמה שהלן לא הייתה זמינה לביצוע הבדיקה של NanoString או אם לא ניתן היה לקבל מהן הסכמה מדעת שב. כל הדגימות בעלות בлок גידול וכל המטופולות שהסתמכו בתתקליה נבדקו כחלק מהמחקר זה.

במחקר זה עשו שימוש בתת-הטוגים הפנימיים שיפקה הבדיקה, והוא בוחן את דירוג ה-ROR באמצעות DRFS. שיעור זה המקביל ממדעת, או שיעור הבדיקה שפורה מה עבר. המקבילים של DRFS רוחש מטופולט של 46 גנים מתוך 50 הגנים של DRFS. שיעור זה המקביל ממדעת של 46 גנים מתוך 50 הגנים של DRFS. שיעור זה קיבעה של כל תת-סוג פנימי, שיעור ההתרבות וגידול גידול כולל. כל הניתנים בוצעו בנתוני מעקב מרביים.

נקודות הסיום הריאטיביות הייתה שיעור הירושדות ללא השונות מרוחקת (DRFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מההבחן ועד להישנות מרווחן השד. נקודות הסיום המשניות היו שיעור הירושדות ללא השונות (RFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מההבחן ועד להישנות הראשונה (מקומית, אזורית או מרוחקת) או למועד כתמצאה מסרטן השד.

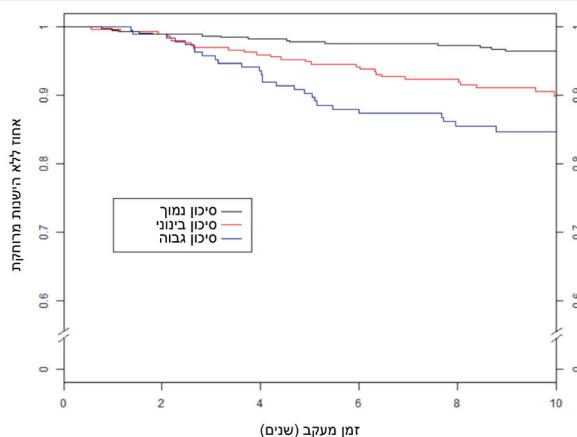
באטען הדגימות המטופוליט הזרמיות, הוכנו מודלים מרובי משתנים של סיכון פרופורציאני (PH) מסווג קוקס כדי להעיר את היעד הראשוני בבדיקות סדרתיות של ROR. המודול כלל את המשתנים המתואימים הקליניים הסטנדרטיים (גיל, שלב הגידול, גודל הגידול הכלול, מצב הקשיות, טיפול משלים (אדג'ובטן)). לאחר מכן נוצר מודול אחד בראקון אס נסוי מ-46 גנים מתוך 50 גנים של DRFS. שיעור זה המקביל עם שיעור דירוג ה-ROR והו שיעור מדויק יותר מאשר דירוג ה-ROR. המודול יתאפשר בדיקת ה-ROR ועומס ב摩יה טסטיטיסטי (p = 0.05) הרובה מילול כל גידול הבדיקה הקליני נושא בעיל מובהקות סטטיסטיות (CTS). דירוג CTS הוא שילוב ממוצע של גורמים קליניים-פטולוגיים שפותחו למידות פטולוגיה סטנדרטית.¹² ניתוח הנתונים הראשיים בוצע שבעור תר-קבוצות שונות של מטופולות (כולל, מצב קשיות שלילי, מצב קשיות חיובי או מצב HER2 שלילי בלבד) ונណודות קצה (DRFS או RFS).

ניתוח

המחקר נקט גישה סדרתית לפחותה היעד המדעי הראשון הוא להוכיח כי שיעור ה-ROR מידע פרוגנוטי מובהק הרבה מהמשתנים הקליניים הסטנדרטיים. היעד הראשוני הוא שיפר דרישת נוספת ליפוי יחסיו מידע פרוגנוטי מובהק הרבה מהמשתנים הקליניים הסטנדרטיים. כדי לעמוד בדרישה זו, אחד מהשנים הבאים דרש הוכחה:

- להוכיח כי דירוג ה-ROR הרץוף מושך ערך פרוגנוטי מובהק הרבה מהמשתנים הקליניים הסטנדרטיים.
- אם היפותזה Null, לפיה לא נוסף כל מידע פרוגנוטי, מובהק הרבה מעבר למשתנים שטחוריות הסיכון (טומוקסיפן/בוגר) מוסיף מידע פרוגנוטי מובהק הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים.

איור 35: DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות שלילי, ו-HER2-שלילי.

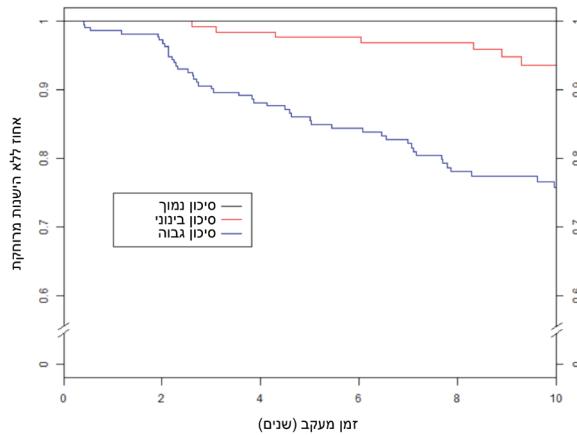


סיכום נתונים עבור איור 35 DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות שלילי, ו-HER2-שלילי.

אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI] [97.9% - 94.3%] 96.5%	מספר אירועים לאחר 10 שנים	מספר מטופלות (%) (48%) 474	קבוצת סיכון
[93.1% - 85.6%] 90%	27	(32%) 311	נמוך
[89.3% - 78.4%] 84.7%	27	(20%) 199	גבוה
	69	984 (100%)	סה"כ

איור 36 מציג את אומדי Kaplan-Meier (KM) ואומדי ההיאරוטה לפי קבוצות סיכון עבור מטופלות עם מצב קשורות שלילי ואIOR 37 מציג את אותן נתונים עבור מטופלות עם מצב קשורות חיובי, עם 3-1 קשורות גנוועות. התוצאות עם ולא המטופלות בעלות ה-HER2- החיובי זהות.

איור 36: DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות)



סיכום נתונים עבור איור 36 DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות)

אחוז משוער ללא הישנות של 10 שנים [95% CI] [100% - 78.2%] 100%	מספר הישנות של 10 שנים	מספר אירועים לאחר 10 שנים	מספר מטופלות (%) (4%) 15	קבוצת סיכון
[97% - 86.9%] 93.6%	7	(37%) 143		נמוך
[81.4% - 68.9%] 75.8%	46	(59%) 224		גבוה
	53	(100%) 382		סה"כ

* הרווח בר-סמן הוערך בעזרת שיטת Clopper-Pearson

מortal 1,620 הרקומות שהוגדרה מראש לאגדול שמתאים להיכיל במחקר, 25 (1.5%) לא עברו את ההערכה הפטולוגית שהוגדרה מראש לאגדול שמתאים להיכיל במחקר, 73 מתוך 1,595 דגימות הרקמה (4.6%) עם רकמה פולשנית חיה לא עברו את מפרט QC-h-RNA, ו-44 מתוך 1,522 דגימות RNA (2.9%) לא עברו את מפרט QC-h-RNA, ו-44 מתוך 1,478 הניטות ה-HER2 (91.2%) רקמות של הבדיקה לתוצאות prosigna, כלומר - לביצוע הניטות ה-HER2 (91.2%) רקמות זמייניות.

מתוך 1,478 מטופלות שהו זמייניות לניטוח, 155חו הישנות מרוחקת ו-194חו הישנות מקומית או מרוחקת, או מותות, כתוצאה מסרטן השד. מעקב החזון של הניטוי ארך 10 שנים.

הבדיקות של הניטות הראשי הראו כי דירוג ROR מספק מידע פרוגנוטטי נוסף מובהק עבור שיעור ההישרדות לאו הישנות מרוחקת הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים (CTS).

טבלה 32: סיכון של בדיקות הניטות הראשי

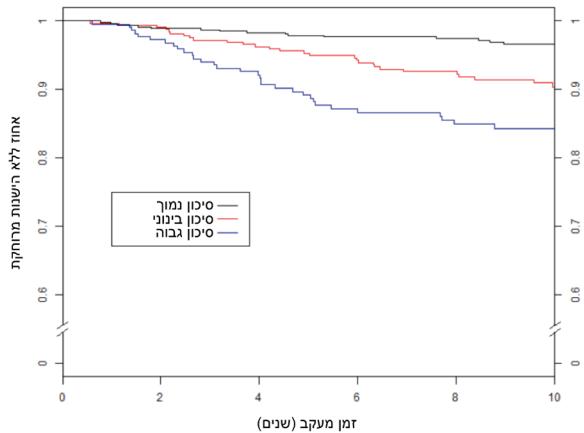
מודל Null	χ^2 עריך קריטי(רמות חופש)	ΔLR χ^2	מודל חלופי	מודל Null
p < 0.0001	3.84 (df = 1)	53.49	CTS + ROR	CTS
p < 0.0001	5.99 (df = 2)	34.12	CTS + CTS קבוצת סיכון	CTS

יתוח ניטונים מושנים הראו כי יש קשר מובהק בין ROR לשיעור ההישרדות לאו הישנות מרוחקת, וכי הוא מוסיף מידע פרוגנוטטי מעבר ל-CTS בתת-קבוצות רבות בעלות רלוונטיות קלינית.

טבלה 33: חזירה על בדיקות ניטוח הראשי עבור תת-קבוצות מוגדרות מראש

קבוצת נבדוקת	CTS+CTS קבוצת סיכון מזול CTS	CTS Mol S CTS+ROR	ΔLR χ^2 (עריך קריטי = 3.84)	מספר EVENTS	מספר מטופלות	מספר מטופלים	קבוצת נבדוקת
				ΔLR χ^2 (עריך קריטי = 5.99)			
הכלל	34.12	53.49	155	1,478	HER2- שלילי	1,397	HER2- שלילי
29.94	47.50	145	86	1,047	NO	984	HER2-,NO
23.36	25.57	79	59	382	N+(1-3)	56	N+(1-3), HER2-,NO
20.32	21.69	59	382	56	367	56	HER2-, שלילי
19.94	25.99						
18.75	22.75						

איור 34: DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 34 DRFS לפי קבוצת סיכון בקשר למטופלות עם מצב קשורות שלילי

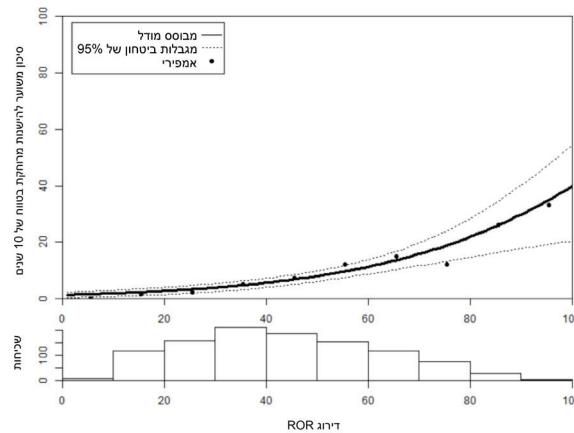
קבוצת סיכון	מספר מטופלים (%) (21%) 225	מספר מטופלים (%) (47%) 487	מספר EVENTS של 10 שנים [95% CI] [97.9% - 94.4%] 96.6%	מספר EVENTS של 10 שנים [95% CI] [93.3% - 86.3%] 90.4%	מספר EVENTS של 10 שנים [95% CI] [88.6% - 78.4%] 84.3%
נמוך	15	(47%) 487	0	7	46
בינוני	28	(32%) 335			
גבוה	32	(21%) 225			
סה"כ	75	1,047 (100%)			

טבלה 34: התפלגות של מטופלות עם מצב קשריות שלילי לפי טווח של 10 יחידות ROR

סיכון-ל-DR בטווח של 10 שנים (אמפירי)	אחוז מטופלות	מספר מטופלות	טווח וה-ROR
0.0%	0.7%	7	10-1
1.8%	11.1%	116	20-11
2.5%	14.8%	155	30-21
5.1%	20.0%	209	40-31
7.5%	17.5%	183	50-41
12.1%	14.5%	152	60-51
15.0%	11.1%	116	70-61
12.3%	7.4%	77	80-71
26.1%	2.7%	28	90-81
33.3%	0.4%	4	100-91
	100%	1,047	סה"כ

איור 39 מציג את העקומה מבוססת המודול עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי במקביל לשיעורי ההישרדות המשוערים אמפירית בטווח של 10 שנים עבורי 10 קבוצות הנזנונים (חוון), כאשר כל קבוצה נתונים מכילה את כל המטופלות בטוחים של 10 יחידות ROR (10-1, 20-11 וכו'). מתחת לעקומה מופיעה היסטוגרמה המציגה את התפלגות השכיחות לפי קבוצות נתונים (חוון).

איור 39: השוואה של אומדנים מובוסי מודול ואומדנים אמפיריים של סיכון DR בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי עם התפלגות של דירוגי ROR מוצגת למטרה



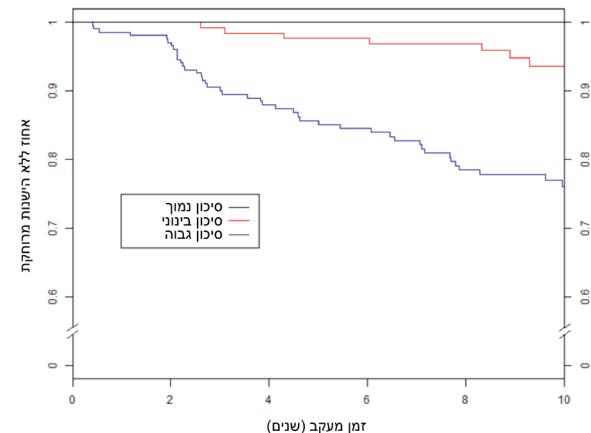
בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי נמצא כי האומדנים מובוסי מודול הסכינים הפרופורציונליים היו דומים לאומדנים האמפיריים בכל השווא. טבלה 35 מציגה את התפלגות של מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) לפי קבוצות נתונים (חוון) של 10 יחידות ROR. גם סיכון DR- ROR בטווח של 10 שנים מופיע.

טבלה 35: התפלגות של מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) לפי טווח של 10 יחידות ROR

סיכון-ל-DR בטווח של 10 שנים (אמפירי)	אחוז מטופלות	מספר מטופלות	טווח וה-ROR
0.0%	0.8%	3	10-1
3.6%	8.9%	34	20-11
4.1%	13.9%	53	30-21
8.5%	17.8%	68	40-31
16.7%	14.9%	57	50-41
17.8%	18.6%	71	60-51
28.9%	11.0%	42	70-61
39.5%	8.9%	34	80-71
33.0%	4.5%	17	90-81
33.3%	0.8%	3	100-91
	100%	382	סה"כ

איור 40 מציג את העקומה מבוססת המודול (שימוש במטופלות עם מצב קשריות חיובי 3-1 קשריות) ודירוגו ROR (80) עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) במקביל לשיעורי ההישרדות המשוערים אמפירית בטווח של 10 שנים עבורי 10 קבוצות הנזנונים (חוון), כאשר כל קבוצה נתונים מכילה את כל המטופלות בטוחים של 10 יחידות ROR (10-1, 20-11 וכו'). מתחת לעקומה מופיעה היסטוגרמה המציגה את התפלגות השכיחות לפי קבוצות נתונים (חוון).

איור 37: לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות), נ-HER2 שלילי



סיכום נתונים עבור איור 37 DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות), נ-HER2 שלילי

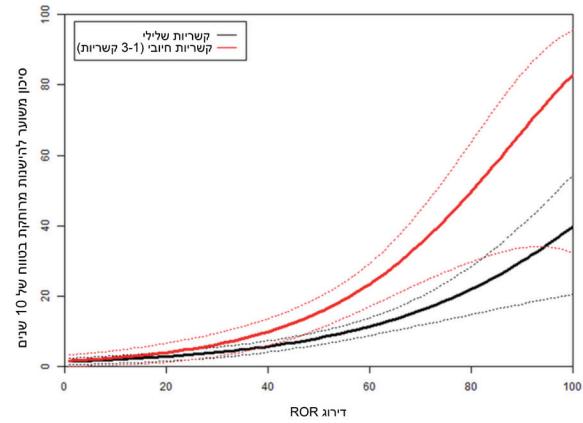
קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער להישנות מרוחקת בטוחה של 10 שנים [95% CI]
נ-HER2	(4%) 15	0	*[100% - 78.2%] 100%
נ-HER2 בינוני	(39%) 142	7	[96.9% - 86.8%] 93.6%
נ-HER2 גבוה	(57%) 210	43	[81.8% - 69.0%] 76.1%
סה"כ	(100%) 367	50	

* הרוח בר-סמרק הוערך באמצעות שיטת Clopper-Pearson.

הקשר בין שיעור ה-ROR וטיבו הטיסכני

איור 38 מציג את הסיכון להישנות מרוחקת (DR) בטווח של 10 שנים כפונקציה של דירוג ROR עם רמות בטיחון של 95% בהתבסס על דגמי הטיסכנים הפרופורציונליים של קוקס עברור כל קבוצת מטופלות במצב קשריות חיובי (3-1 קשריות), הופרכה הנחת הטיסכנים בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) והעקומה המוצגת כאן למטופלות הפרופורציונליים בעלת הנטיין לצבע התאמת בכל הטווח. העתקה שימוש במטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) עשויה שמשה ב证实 של דירוג ROR בטווח של 0-80, שבעבור אומתה הנחת הטיסכנים הפרופורציונליים.

איור 38: הטיסון המשוער להישנות מרוחקת (DR) בטווח של עשר שנים לפי קטגוריות מצב קשריות עם רמות סמך של 95%



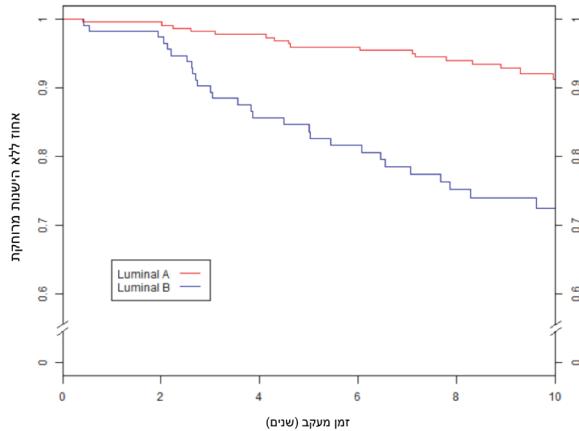
בכל מת-קבוצה, הטיסון הקליני האבסולוטי של המטופלות שהוקצו לקטגוריות הטיסכנים הנ-HER2, היה שונה באופן מהותי מהטיסון הקליני האבסולוטי של המטופלות שהוקצו לקטגוריות הטיסכנים�� (high).

טבלה 34 מציגה את התפלגות של מטופלות עם מצב קשריות שלילי לפי קבוצות נתונים (bins) של 10 יחידות ROR. גם סיכון DR- ROR בטווח של 10 שנים מופיע.

סיכון נתונים עבור אירור 41 עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier (KM) לת-סוג פנימי (3-1 קשורות) עבור מטופולות בעלות מצב קשורות שלילי

אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטוחו [95% CI] של 10 שנים לארוך	מספר אירומים לארוך של 10 שנים	מספר מטופולות	קבוצת סיכון
[96.3% - 93.4%] 95.1%	32	725	Luminal A
[90.3% - 83.2%] 87.2%	32	284	Luminal B
	64	1,009	סה"כ

איור 42: עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier (KM) לת-סוג פנימי עבור מטופולות בעלות מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות)



סיכון נתונים עבור אירור 42 עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier (KM) לת-סוג פנימי (3-1 קשורות) עבור מטופולות בעלות מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות)

אחוז משוער ללא הישנות [95% CI] מרוחקת בטוחו של 10 שנים לארוך	מספר אירומים לארוך 10 שנים	מספר מטופולות	קבוצת סיכון
[94.2% - 87.2%] 91.3%	17	248	Luminal A
[79.1% - 64.2%] 72.5%	28	118	Luminal B
	45	366	סה"כ

טבלה 37 מציגה טבלה של שיעורי RFS בטוחו של 10 שנים לפי לת-סוג לומינלי עבור הקבוצות בעלות מצב קשורות שלילי ומצב קשורות חיובי (3-1 קשורות).

טבלה 37: שיעורי RFS בטוחו של עשר שנים לפי קבוצת קשורות ות-סוג לומינלי

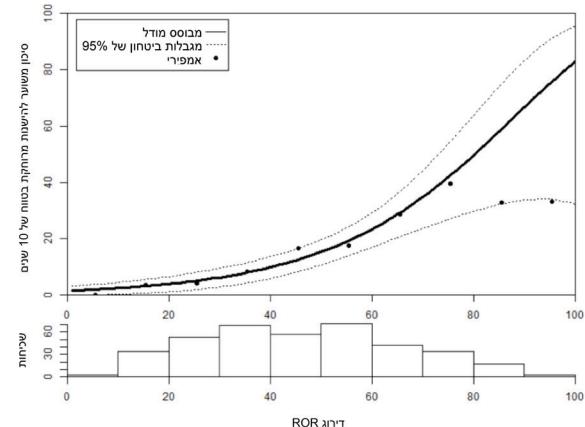
אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בוחנו של 10 שנים [95% CI]	מספר אירומים לאורך 10 שנים	מספר מטופולות (%)	ת-סוג לומינלי	מצב קשורות
[94.5% - 91.1%] 93.0%	44	725 (72)	Luminal A	N0
[85.9% - 77.6%] 82.2%	44	284 (28)	Luminal B	
[92.4% - 84.7%] 89.1%	21	248 (68)	Luminal A	
[77.4% - 62.2%] 71.6%	30	118 (32)	Luminal B	N+(1-3)

עבור כל אחת מהאוכלוסיות של המטופולות בעלות מצב קשורות שלילי ובועלות מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות), ההבדל בין מטופולות A ו-Luminal B יהיה מובהק.

מסקנות של מחקר קליני 2

הוכח כי ה-ROR מוסף מידע פרוגנוטטי מובהק הרבה לעומת למשתנים הקליניים והטיפולוגיים הסתנדרתיים, הן כשהוא נכלל כמדד רצוף והן כשהוא נכלל בעזרת שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. קבוצת הסיכון הנמוך גילה שיעור DRFS בטוחו של 10 שנים גבוהה בהרבה מ-90%, בעוד קבוצת הסיכון הגבוהה גילה שיעור DRFS בטוחו של 80%, אשר היה גבוה מן האפשרי—האטייה הש�ה הרבה יותר נマー מ-80%. ערך הסף (cutoffs) אשר שימושו את המחקר להגדלת קבוצות הסיכון היו מובוסים על הקווורט של TransATAC, המהווה סיכון גבוה יותר מאשר הקווורט הנוכחי, לעומת המובילה ל"קבוצת סיכון גבוהה" בעלת סיכון כולל נמוך יותרמן הצפוי. שיעור ה-ROR (עקב' ו-ומבויס קבוצת סיכון) גילה מידע פרוגנוטטי דומה בתת-קבוצות שונות. מודל הסיכון הרצוף מתאים מאד לשיעורי הישנות האמפיריים בקשר אוכלוסיות של מטופולות בעועלות מצב קשורות שלילי ובועלות מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות). לרוב המטופולות (96%) במחקר היו גידולים שהשתיכו לאחד משני תת-הסוגים הלומינליים (Luminal A או B) (Luminal B). בכל הקבוצות של מצב הקשורות, הבחנה בין B ו-Luminal A מוגדרת בקשרו לשיעור DRFS.

איור 40: השוואת של אומדנים מבוססי מודול ואומדנים אמפיריים של סיכון DR בטוחו של עשר שנים בקשר מטופולות עם מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות) עם התפלגות של דירוגי ROR מוגדר



טבלה 35 ואירור 40 מציגים שניהם את השוואת העוקמה של הסיכון הנכפה בטוחו של עשר שנים בגבול העליון של ה-ROR. עובדה המעידת על הפרכה של הנחת הסיכונים הפרופורציונליים. עם זאת, יש לציין כי גודלי הדגימה בשתי קבוצות הנתונים מעלה-ל-80% היי שניהם קטנים בקשר מטופולות עם מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות) (17 מטופולות בטוחו שבין 80–81 וריך 3 בטוחו שבין 90–91%).

השוואה בין תת-הסוגים הפנימיים Luminal B ו-Luminal A

הריבית הנבדקות במחקר (96%) היא בעלות לת-סוג Luminal A או B. נובירה צפופה בהתחשב בכך שהסוגים הפנימיים הללו דמייניטים בקשר מטופולות בעלות גידולי קולtan הורמוני חיובי.¹²

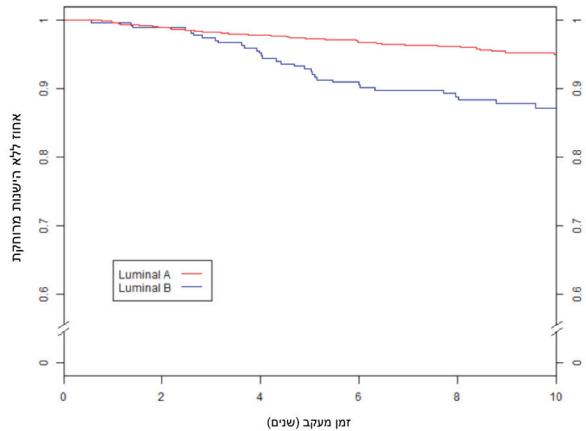
טבלה 36 מציגה את התוצאות של בדיקת יחס הנירות עד להציג את הערך הפרוגנוטי הנוסף DRFS שמוסיפה הבדיקה בין תת-הסוגים Luminal A/Luminal B לבין R-CTS. הטבלה מציגה גם את יחס הסיכון בהשוואה בין Mетופולות עם A ל-Metoprolol עם B. בקשר מטופולות עם A נצפה שיעור נמוך באופן מובהק ליחסנות מרוחקת בכל שלוש הקבוצות.

טבלה 36. בדיקת יחס הנירות עבור ערך פרוגנוטי לשיעור DRFS של תת-הסוגים הלומינליים

ת-סוג : LumA : LumB (95% CI)	יחס סיכון עבור ערך פרוגנוטי (95% CI)	χ^2 ערך- χ^2	ΔLR	# איזומרים	# מטופולות	ת-סוג קבוצה
[0.59 - 0.30] 0.42	0.0001 >	24.42	135	1,422	hcil	hcil
[0.75 - 0.30] 0.47	0.0019	9.68	74	1,009	NO	NO
[0.58 - 0.19] 0.33	0.0001	14.94	51	366	(3-1)	(N+)

איור 41 מציג השוואת של שיעור ה-ROR לאיור 42 מציג את אותה השוואה בעבור מטופולות עם מצב קשורות שלילי, איור 42 מציג את אותה השוואה בעבור מטופולות עם מצב קשורות חיובי (3-1 קשורות). בשתי הקבוצות הタルים הבדלים מובהקים בין שיעור ה-ROR בקשר מטופולות עם לת-סוג Luminal A ו-Luminal B.

איור 41: עקומות DRFS (KM) לשיעור Kaplan-Meier (KM) לת-סוג פנימי עבור מטופולות בעלות מצב קשורות שלילי.



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: the ABCSG-8 trial. Lancet 2005; 366(9484): 455-462.

Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. Lancet Oncology 2006; 7(12): 991-996.

Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial. Annals of Oncology 2014; 25(2): 339-45.

18 סמלים והגדירות

- יצור:

EC REP

- נציג מורשה בקהילה האירופית

IVD

- מכשיר רפואי דיאגנוטי מסווג *in vitro* (נערכ במעבדה)

i

- עין בהוראות השימוש

CE

- סימן

LOT

- קוד אצווה / מספר מנתה

REF

- מספר קטלוג או סימוכין

Σ

- מכל כמות מספקת ל-<ח> בדיקות

↑

- תנאי אחסון טוח טמפרטורת

↓

- תנאי אחסון גובל תחתון של טמפרטורה

☒

- לשימוש עד / תאריך תפוגה

↑↑

- הצד זהה כלפי מעלה

Room Temp. = טמפרטורת החדר

HYB = היברידיזציה (הכלאה)

כתב יתור ורגולטורי

לשימוש בגבון מסווג *in vitro* (נערכ במעבדה).

© VERACYTE, INC 2023. כל הזכויות שמורות. VERACYTE, INC והלוגו של VERACYTE, PROSIGNA ו-PROSIGNA NCOUNTER הם סימנים מסחריים של VERACYTE, INC. ושל חברות המתמחות לה. VERACYTE, INC הוא סימן מסחרי של NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC.

סיכום של שילוב המחקרים הקליניים

ניתן להכליל את התוצאות ולהפיץ אותן לשימוש נרחב שządיגות נשלחו למעבדות שונות ומגוונות שונות בשני מחקרים התקין הקליניים. נכון כי ה-ROR מושך מידע פרגונומטי מובהק לשיעור DRFS בטוחו של 10 שנים, הרבה מעבר למשתנים הקליניים וטיפוליים הסטנדרטיים, הן כשהוא נלכד כמעט בכל ביצוע שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. כמו כן, אნגייזט פויסט-הוק, ה-ROR הוסיף מידע מובהק לשיעור DRFS אחרי 5 שנים הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים עבור כל הטופולות. שער ה-ROR (עקביו ומבוסס קבוצת סיכון) אלה מיעט פרגונומטי דומה בתת-קבוצות שונות. בוצעו גם ניתוחות מוגבלות בעררת RFS. קבוצות ה-ROR הצביעו גם להגדר שלוש קבוצות סיכון עם נפרד. בשני המחקרים התגלו הבדלים מובהקים בין שער ה-ROR DRFS- בקבוצות בעלות תת-הסוג Luminal A ו-Luminal B, ללא קשר למצב הקשיות.

17ביבליוגרפיה

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression .25–317:26 ;with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008 .1
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based ,2009 Journal of Clinical Oncology on כתוב העת On Intrinsic Subtypes. .1167-1160 : (8)27 .2
- Dowsett M. et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. כתוב העת Therapy. .90-2783:(22)1;31 2013 .3
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-Clinical treated estrogen receptor positive breast cancer. .5232-5222 :16 ;2010 Cancer Research .4
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast .471-458 :2009 .5
- The External RNA Controls Consortium Baker SC, et al. קונסורציום Baker SC, et al. .Nature Methods 2010; 2: 731-734 .6
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance —of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline מהדורה שנייה. הארגון העולמי למעבדות רפואי (CLSI). כרך .24 .7
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the Journal of Clinical Oncology. JCO.2014.55.6894 באוקט' 20 ;2014 Oncology .8
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the .11(12):1135-41 ;2010 Lancet Oncology כתוב העת ATAC trial. .9
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. .30(7): 722-728;2012 Journal of Clinical Oncology .10
- 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 TransATAC Study. מאמר 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 TransATAC Study. מאמר .11
- Cuzick J, et. al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. .4273-4278 :29 ;2011 Journal of Clinical Oncology .12

19 פרטיטים לייצור קשר

 פרטיים לייצור קשר בארה"ב:

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

EC REP

נציג מושה באיחוד האירופי:
Veracyte
Luminy Biotech Enterprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

בעל רשות: א.י. אל אמרגו ישראל בע"מ, רח' אדרה סחרוב 9,
מת"מ, ת.ד. 15054, חיפה, 3190501
טלפון: 02-6731634
מספר רישום אמ"ר:

פרטיטים גלובליים לייצור קשר:
תמכה טכנית דוא"ל: DxSupport@Veracyte.com
דוא"ל פרטי מוצב: info@prosigna.com
אתר אינטרנט: www.prosigna.com