

עלון המצורף לאריזה
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature
Assay (בדיקת Prosigna® של חתימה גנומית לסרטן שד
לקביעת מדד פרוגנוסטי)



בדיקות 10-1

תנאי אחסון

מחסניות לבדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי	-20 °C Store at -20° C or below
Codeset לבדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי	-80 °C Store at -80° C or below
חבילת הכנה לבדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי	+25 °C Store at room temperature +15 °C
משטחי הכנה לבדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי	+8 °C Store at +4° C +2 °C

תוכן עניינים

1	שימוש מיועד / מטרה	1
2	סקירה קצרה של מערכת הבדיקה	2
2.1	עקרונות המערכת nCounter Analysis System	2.1
2.2	עקרונות האלגוריתם של Prosigna לחישוב פלט	2.2
3	ריאגנטים וציוד מסופקים	3
3.1	סקירה כללית של ערכת Prosigna	3.1
3.2	התכולה של ערכת Prosigna לערכת Prosigna המכילה 1, 2, 3, 4	3.2
3.2	10 בדיקות	3.2
4	אזהרות ואמצעי זהירות	4
5	שיקולים כלליים בבדיקה	5
5.1	עיבוד רקמות	5.1
5.2	ביצוע הבדיקה של Prosigna	5.2
6	מידע בנושא הכשרה	6
7	טיפול בפסולת	7
8	אחסון וטיפול (ריאגנטים)	8
9	המשטחים הדרושים לבדיקת PROSIGNA	9
10	ריאגנטים וציוד נדרשים, אך לא מסופקים	10
10.1	חומרים	10.1
10.2	ציוד	10.2
10.3	מפרטי ציוד	10.3
11	איסוף ועיבוד הדגימות	11
11.1	דרישות דגימות הרקמה וסקירה פתולוגית	11.1
11.2	איסוף ואחסון הדגימות	11.2
11.3	הכנה של זכוכיות הנושא	11.3
11.4	עיבוד של זכוכיות הנושא	11.4
11.5	בידוד ה-RNA	11.5
11.6	מידת הריכוז והאיכות של ה-RNA	11.6
11.7	הליך הבדיקה	11.7
12	פתרון בעיות וכשלים בבדיקות	12
13	תוצאות הבדיקה	13
13.1	תת-סוגים פנימיים	13.1
13.2	דירוג הסיכון להישנות המחלה (ROR)	13.2
13.3	הסתברות של הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים	13.3
13.4	סיווג הסיכון	13.4
13.5	בקרת איכות	13.5
14	מגבלות ההליכים	14
15	הערכים הצפויים	15
15.1	טווח ה-ROR לפי תת-סוג	15.1
15.2	שינוי של דירוג ROR לפי מצב קשירות	15.2
15.3	שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת לפי סיווג סיכון	15.3

16	מאפייני ביצועים	16
16.1	דיוק אנליטי והדירות	16.1
16.2	רגישות / פלט RNA	16.2
16.3	בדיקת הפרעות	16.3
16.4	ביצועים קליניים	16.4
17	ביבליוגרפיה	17
18	סמלים והגדרות	18
19	פרטים ליצירת קשר	19

1 שימוש מיועד / מטרה

בדיקת Prosigna® של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי היא בדיקת אבחון *In Vitro* (נערכת במעבדה) אשר משתמשת בפרופיל ביטוי הגנים של תאים שנמצאו ברקמת סרטן שד כדי להעריך את הסיכון להישנות מרוחקת של המחלה אצל מטופלת. הבדיקה מודדת את פרופיל ביטוי הגנים באמצעות RNA שחולץ מרקמת סרטן שד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE). נתוני ביטוי הגנים משוקלים יחד עם משתנים קליניים לקביעת תת-סוג (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, או Basal-like) וכן לקביעת דירוג המצביע על ההסתברות להישנות מרוחקת של המחלה. הבדיקה מתבצעת במערכת nCounter® Analysis System על-ידי שימוש ברקמת סרטן שד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) שאובחנה קודם לכן כרקמה נגועה בסרטן שד פולשני.

בדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי מיועדת למטופלות עם סרטן שד שעברו כריתת שד או טיפול משמר שד בשילוב עם טיפול מקומי או אזורי בהתאם לתקן הטיפול, לפי אחד המקרים הבאים:

- א. סמן פרוגנוסטי להישרדות ללא הישנות מרוחקת תקף לעשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד בשלב I או II, ללא סרטן בקשירות לימפה, עם גידולי קולטן הורמון חיובי (HR+) המתאים לטיפול אנדוקריני משלים (אדג'בנטי) בלבד, בעת שימוש בשילוב עם גורמים קליניים-פתולוגיים נוספים.
- ב. סמן פרוגנוסטי להישרדות ללא הישנות מרוחקת תקף לעשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד בשלב II או IIIA, עם סרטן בקשירות לימפה (3-4 קשירות נגועות, או 4 קשירות נגועות ומעלה), עם גידולי קולטן הורמון חיובי (HR+) המתאים לטיפול אנדוקריני משלים (אדג'בנטי) בלבד, בעת שימוש בשילוב עם גורמים קליניים-פתולוגיים נוספים.

2 סקירה קצרה של מערכת הבדיקה

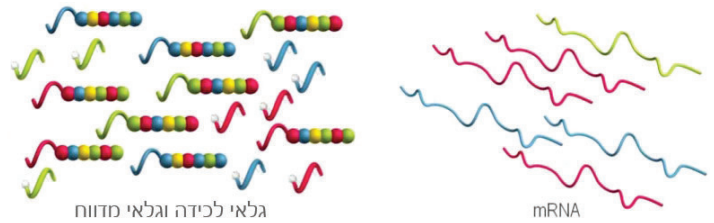
מערכת nCounter Analysis System מספקת מדידות ישירות, מרובות, של ביטוי גנים באמצעות קריאות דיגיטליות של השפע היחסי של שעתוקי mRNA באמצעות השלבים הבאים: (1) הכלאה (היברידיזציה) של RNA לגלאים מדווחים ולגלאי לכידה פלואורסצנטיים, (2) טיהור של תרכובות המטרה/הגלאים באמצעות nCounter Prep Plates (משטחי הכנה של nCounter) שמכילים ריאגנטים (חומרים מגיבים) הנחוצים לעיבוד שלאחר ההכלאה וקיבוע במחסנית nCounter בתחנת ההכנה של nCounter, ולבסוף (3) ניתוח של מחסנית nCounter בכלי הניתוח הדיגיטלי של nCounter כדי לספק תוצאת בדיקה¹. גם גלאי הלכידה וגם הגלאי המדווח מכילים רצפים ייחודיים של גלאי דנ"א לצורך הכלאה וטיהור של המטרה. את גלאי הלכידה והגלאים המדווחים יש לשלב עם בקורות חיוביות ושליטיות ליצירת CodeSet. בדיקת Prosigna מודדת בו-זמנית את רמות הביטוי של 50 גנים המשמשים לאלגוריתם הסיווג לתת-סוגים פנימיים², 8 גנים של תחזוקה שוטפת המשמשים לנורמליזציה אותות, 6 בקורות חיוביות ו-8 בקורות שליטיות בתגובת הכלאה בודדת, באמצעות גלאים של חומצת גרעין שתוכננו במיוחד עבור גנים אלה. בערכת Prosigna כלולה גם דגימת ייחוס המכילה מטרות RNA שעברו שעתוק *in vitro* (במעבדה) עבור כל אחד מ-58 הגנים. דגימת הייחוס נבדקת עם כל אחת מאצוות דגימות ה-RNA של המטופלות כדי לאשר את ההרצה ולנרמל את האות מכל גן.

בדיקת Prosigna מתבצעת על-גבי RNA שבודד מרקמת סרטן שד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE). פתולוג בוחן זכוכית נושאת צבועה בהמטוקסילין ואוזון (H&E) ומזהה (ומסמן) את האזור הנגוע בסרטן שד פולשני שמתאים לבדיקה. בנוסף, הפתולוג מודד את שטח הפנים של הגידול, שלפיו ייקבע מספר זכוכיות הנושא הלא צבועות הדרושות לבדיקה, ואת תאיות הגידול כדי לוודא נוכחות של רקמת גידול בכמות מספקת עבור הבדיקה. טכנאי מיומן מבצע חתכי מאקרו באזור שעל-גבי זכוכיות הנושא הלא צבועות בהתאם לאזור הגידול המסומן על הזכוכית הצבועה ב-H&E ומבודד את ה-RNA מהרקמה. בשלב הבא, ה-RNA המבודד נבדק במערכת nCounter Analysis System כדי לספק תוצאות בדיקה, כולל תת-סוג הפנימי, מידת הסיכון להישנות המחלה (ROR - Risk of Recurrence) וקטגוריית סיכונים.

2.1 עקרונות המערכת nCounter Analysis System

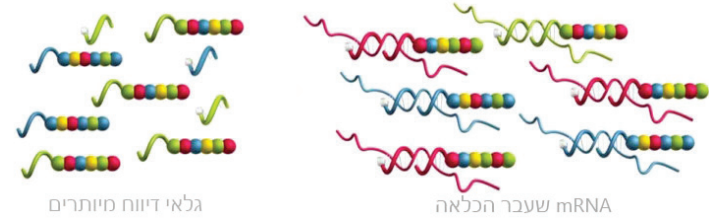
המערכת nCounter Analysis System משתמשת בצמדי גלאים ספציפיים לגן (איור 1) הנקשרים ישירות לדגימת mRNA בתמיסה, ומבטלת תגובות אנזימטיות שעלולות להטות את התוצאות. בשלב הראשון של הבדיקה, גלאי הדנ"א נקשרים ישירות לאזור המכיל 70–100 זוגות בסיסים בדגימת ה-RNA שבתמיסה. הגלאי הפלואורסצנטי המדווח מכיל רצף של 35–50 גלאים בסיסיים, אשר משלים את מטרת ה-mRNA ורצף דנ"א ייחודי מסוג Backbone המבצע הכלאה לשישה מקטעי RNA המסומנים באחד מארבעת הצבעים הפלואורסצנטיים: אדום (R), צהוב (Y), כחול (B), או ירוק (G). המקטעים הפלואורסצנטיים יוצרים "קוד צבע" פלואורסצנטי בעל שישה מקומים/ארבעה צבעים, שהנו ייחודי לכל מטרה. גלאי לכידה נפרד מכיל רצף של 35–50 גלאים בסיסיים, אשר משלים את מטרת ה-mRNA וביוטין, המשמש לקיבוע בזכוכית בצפיף סטרפטובידין (Streptavidin).

איור 1: הכלאת Codeset ל-mRNA



לאחר ההכלאה, כל שלבי הטיהור של הדגימה מתבצעים באופן אוטומטי בתחנת ההכנה של nCounter. תחילה, מתבצעת הסרה של גלאים מדווחים וגלאי לכידה מיותרים (איור 2) באמצעות שלבי לכידה של חרוזים מגנטיים רציפים וקשירת קומפלקסים גלאי-מטרה למיקומים אקראיים על גבי משטח המחסנית nCounter דרך קשירת סטרפטובידין-ביוטין (איור 3). לבסוף, הקומפלקסים גלאי/מטרה מיושרים ומקובעים (איור 4) במחסנית nCounter.

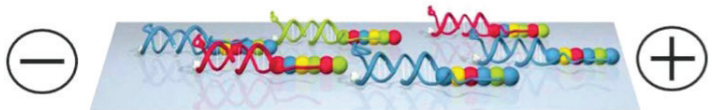
איור 2: הסרה של גלאים מדווחים מיותרים



איור 3: קשירת גלאים מדווחים שעברו הכלאה למשטח המחסנית



איור 4: יישור וקיבוע של גלאים מדווחים שעברו הכלאה



לאחר סיום הטיפול בדגימה, מניחים את המחסנית בכלי הניתוח הדיגיטלי של nCounter לאיסוף נתונים. כל מולקולת מטרה שיש בה עניין מזהה על-ידי "קוד הצבע" שנוצר על-ידי שישה "כתמים" (spots) פלואורסצנטיים הנמצאים על הגלאי המדווח המשוך אליה. לאחר מכן סופרים את הגלאים המדווחים שעל משטח המחסנית, עורכים אותם בטבלאות עבור כל מולקולת מטרה ומעבדים אותם עם האלגוריתם (איור 5).

איור 5: איסוף נתונים

קוד	גן	ספירה
1	x	3
2	y	1
3	z	2

2.2 עקרונות האלגוריתם של Prosigna לחישוב פלט

הבדיקה מבוססת על האלגוריתם המדווח לסיווג 50 גנים, המכונה במקור PAM50², והיא מבוצעת במערכת nCounter Analysis System באמצעות RNA שחולץ מדגימות של רקמת סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE). האלגוריתם משתמש בפרופיל ביטוי של 50 גנים כדי לשייך את סרטן השד לאחת מארבע קבוצות מולקולריות, או תת-סוגים פנימיים: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, או Basal-like². הפרופילים האב-טיפוסיים לביטוי גנים (לדוגמה, צנטרואיד) של ארבעת התת-סוגים הפנימיים נשמרו במערכת nCounter Analysis System באמצעות דגימות של סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) שנאספו מאתרים קליניים מרובים בצפון אמריקה. לאחר ביצוע הבדיקה על דגימה לבדיקה של מטופלת, אלגוריתם חישובי המבוסס על מתאם פירסון משווה את פרופיל הביטוי המנומלל של 50 גנים של אותה דגימה לבדיקה של המטופלת, לפרופיל הביטוי האב-טיפוסיים של ארבעת התת-סוגים הפנימיים של סרטן השד. הדגימה לבדיקה של המטופלת משויכת לתת-הסוג בעל מתאם פירסון הגבוה ביותר.

לאחר מכן מדווח האלגוריתם על מידת הסיכון להישנות המחלה (ROR) בסולם של 0–100³, שיש מתאם בינה לבין ההסתברות להישנות מרוחקת בטווח של עשר שנים אצל נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם בעל גידולי קולטן הורמון חיובי (HR+)⁴. הדוח מספק גם קטגוריית סיכון (נמוכה, בינונית או גבוהה). מידת הסיכון להישנות המחלה (ROR) מחושבת בעזרת מקדמים ממודל קוקס הכולל מתאם פירסון של תת-קבוצה בת 46 גנים מתוך 50 הגנים לכל צנטרואיד של תת-סוג פנימי, שיעור התרבות וגודל גידול כולל. מכפילים את משתני הבדיקה במקדמים המתאימים של מודל קוקס כדי ליצור ציון, המותאם לאחר מכן לסולם 0–100 המבוסס על מקדמים שנוצרו מערכת הלימוד של דגימות סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE). בנוסף, קטגוריות סיכון מדווחות בהתבסס על ערכי סף (Cut-off) של ROR שנקבעים במחקר אימות קליני.

3 ריאגנטים וציוד מסופקים

3.1 סקירה כללית של ערכת Prosigna

ערכת Prosigna מכילה ריאגנטים במספר המאפשר עיבוד של 1, 2, 3, 4 או 10 דגימות של מטופלות, בהתאם למוצר שהוזמן. לקבלת פרטי הזמנה עיין למטה. ערכת Prosigna מכילה CodeSet, מבחנה עם דגימת ייחוס לכל ערכה המכילה 1–10 בדיקות, ורכיבים מתכלים, הנבדקים יחד לבדיקת ביצועים לפני המשלוח.

מספר קטלוגי	מספר בדיקות בערכה	מבחנות דגימות ייחוס כלולות
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

מומלץ לשימוש בשילוב עם הערכה Roche FFPE RNA Isolation Kit (Roche-FFPE-025) או ערכת מיצוי RNA של Veracyte FFPE (550100). שתי ערכות מיצוי ה-RNA זמינות רק דרך Veracyte.

3.2 התכולה של ערכת Prosigna לערכת Prosigna המכילה 1, 2, 3, 4 או 10 בדיקות

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

Contents Description

Prosigna CodeSet

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

Prosigna Prep Plates

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

Prosigna Cartridges

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

Prosigna Prep Pack

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

4 אזהרות ואמצעי זהירות

1. לשימוש באבחון *In Vitro* (במעבדה).
2. בדיקה זו נועדה להתבצע על-ידי מפעילים אשר עברו הכשרה בטכניקות מורכבות במיוחד של ביולוגיה מולקולרית, בהתבסס על תקנות מקומיות.
3. אין לערבב בין רכיבי ערכות במנות (lot) שונות של Prosigna. ניתן להבטיח פעילות תקינה של ערכות Prosigna אך ורק במנות שנקבעו במהלך הייצור.
4. אין לעשות שימוש חוזר בשאריות ריאגנטים בבדיקה של Prosigna.
5. השליך את כל התגובות שעלויות לשאת פוטנציאל לסיכון מבחינת זמני הכלאה או טמפרטורות הכלאה.
6. חשוב לשמור על שלמות שרשרת הדגימה (רקמה ל-RNA ו-RNA לבדיקה) כדי להבטיח שמזהה הדגימה של המטופלת משויך לתוצאת הבדיקה הנכונה.
7. אחסון שגוי של ריאגנטים, שלא על פי התנאים המופיעים על גבי התווית, עלול לפגוע בביצועי הבדיקה.
8. בזמן הטיפול בריאגנטים ובדגימות, לבש תמיד כפפות.
9. הימנע מזיהום RNase, אשר עלול להשפיע באופן שלילי על איכות התוצאות.
10. יש לטפל בכל הדגימות והחומרים הביולוגיים תוך ידיעה שהם עלולים להוות סיכון להעברת חומרים מזדמנים, ולהשליך אותם על פי אמצעי הזהירות העומדים בתקנות הפדרליות, המדיניות והמקומיות.
11. הקפד לא להשתמש בפיפטה בעזרת הפה.

12. הימנע ממגע של ריאגנטים עם עיניים, עור וממברנות ריריות.
13. השתמש בשיטות עבודה מומלצות של מעבדות מולקולריות כדי למנוע זיהום תוך מעבדתי בין דגימות הבדיקה או עם מטרות חומצות גרעין בריכוז גבוה (סינתטי או אמפליפיקציה של PCR) שעלול להשפיע באופן שלילי על איכות התוצאות.
14. לאחר התהליך, משטחי ההכנה לבדיקת Prosigna ומחשיות nCounter עשויים לכלול רמות נמוכות מאוד של אזיד הנתרן (> 0.1%), לכן מומלץ להשתמש בכלי קיבול מפלסטיק (ולא מתכת) כדי להשליכם. על אף שהסבירות לכך בבדיקת Prosigna נמוכה מאוד, ידוע כי הצטברות של אזיד הנתרן על מתכת עלולה לגרום לפיצוץ מסוכן.
15. ניתן למצוא פרטים נוספים לגבי השלכה של מכשירים ספציפיים ב'מדריך למשתמש של המערכת nCounter Analysis System' ובמדריכי השירות של תחנת ההכנה וכלי הניתוח הדיגיטלי.
16. ניתן למצוא מידע לגבי גיליונות הבטיחות של חומרים (MSDS) עבור CodeSet לגלאי מדווה, ProbeSet לגלאי לכידה, בופר הכלאה ומשטחי הכנה בכתובת www.prosigna.com.
17. יש להשליך את כל החומרים המסוכנים בהתאם להנחיות הארגון שלך בנושא השלכת חומרים מסוכנים.
18. יש להשליך כל CodeSet שלא נעשה בו שימוש.
19. אם קטגוריית גודל הגידול של מטופלת כלשהי אינה מוזנת כהלכה בתוכנה, הדבר עלול להשפיע באופן שלילי על דירוג מידת הסיכון להישנות המחלה (ROR) ועל סיווג הסיכון (לדוגמה, דירוג ROR שונה /או סיווג שגוי).
20. אם מצב הקשריות של המטופלת אינו מוזן כהלכה בתוכנה, דיווח תוצאות הבדיקה של המטופלת עלול להיות שגוי (לדוגמה, סיווג סיכון שגוי).
21. אין להשתמש ב-RNA בעל איכות ירודה או כמות נמוכה או בדגימות גידול בעלות שטח פנים גידול קטן מדי או תאיות בלתי מספקת בבדיקה של Prosigna. ייתכן שהבדיקה של Prosigna לא תניב תוצאה תקפה ובמקום זאת, תקבל דיווח על כישלון הבדיקה.

שיקולים כלליים בבדיקה

1. הבדיקה נועדה לשימוש בדגימות של רקמת סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE), אשר הוסרו בנייתו בלבד. היא לא נועדה לשימוש ברקמת סרטן חיה, קפואה או ברקמת סרטן שאינו סרטן שד.
2. הגודל הכולל של הגידול הראשוני של מטופלת ומצב הקשריות נדרשים לביצוע הבדיקה.
3. השתמש בקצוות חד-פעמיים (טיפים) וסטריילים למיקרו-פיפטות כדי להימנע מזיהום חידקי וגרעיני של ריאגנטים או דגימות במהלך העיבוד.
4. שמור את דגימות ה-RNA המבודד על קרח רטוב כאשר לא מבצעים עליהן מניפולציה באופן פעיל.
5. תרמומטרים מכילים נדרשים לבדוקים של חימום.
6. אין להשתמש ברכיבי ערכה אם הם פגומים.
7. מומלץ שמעבדות המפעילות Prosigna יפתחו בקרים קליניים (לדוגמה, לקטגוריית סיכון) וישתמשו בהם כדי להבטיח את דיוק התוצאות לאורך זמן כחלק מנהלי בקרת איכות תקינים של מעבדות.

5.1 עיבוד רקמות

1. חוסר יכולת להסיר בהצלחה רקמה סמוכה שאינה רקמת גידול/רקמה רגילה באמצעות מאקרו-דיסקציה במהלך הטיפול ברקמה עלול להוביל להערכת חסר של הסיכון עקב דירוג ROR נמוך יותר המדווח לרופא.
2. חוסר יכולת להסיר בהצלחה דנ"א גנומי אנושי במהלך בידוד RNA עלול להוביל לשיעור כישלון גבוה יותר עקב אות בדיקה נמוך יותר, או הערכת יתר של סיכון עקב דירוג ROR גבוה יותר המדווח לרופא.
3. יש להניח את כל קטעי הרקמה הלא צבועה על גבי זכוכית נושא למיקרוסקופ, בעלות מטען חיובי, כדי למנוע היפרדות במהלך הטיפול ברקמה.
4. דגימות הדורשות זכוכית נושא מרובות, יש לטפל בכל הזכוכיות יחדיו.
5. קטעי רקמה המונחים על זכוכית נושאות עלולים להתפרק אם תאחסן אותם למשך יותר מ-9 חודשים בסביבה יבשה.
6. החלף 3% מתמיסת השימוש גליצרול מדי שבוע, או אם התמיסה הופכת להיות עכורה, כדי למנוע זיהום.
7. החלף את תוכן השטיפה הראשונה של די-לימון (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-4 ערכות זכוכית, ואת האתנול (EtOH) ואת תוכן כלי הצביעה השני של די-לימון (D-Limonene) לאחר הטיפול ב-8 ערכות זכוכית כדי למנוע פגיעה באיכות הרקמה.
8. נקוט זהירות במהלך סימון אזור הגידול על גבי הזכוכית הנושאת שלא נצבעה ובמהלך הסרת הרקמה שאינה רקמת גידול, כדי לוודא שרקמת הגידול אינה מופרעת.
9. טפל בזהירות בחפצים חדים במהלך המאקרו-דיסקציה.

10. השתמש בסכין חדשה עבור כל דגימת רקמה שאתה מטפל בה.
11. לרוב, SDS 10% שוקע בטמפרטורת החדר ויש לחממו לטמפרטורה של 37°C עד להמסת המשקע.*
12. יש לבדוק מנות/אצוות חדשות של ערכות בידוד RNA כנגד הספסיפיקציות (מפרטים) של ערכת הבידוד כדי להגדיר את מנות הערכה החדשות לבדיקת מטופלות (ראה סעיף 11.5 לקבלת פרטים).
- * 10% SDS נדרש אך לא מסופק עבור ערכת הבידוד RNA של Roche FFPE.

5.2 ביצוע הבדיקה של Prosigna

1. הקפד להזין כהלכה בתוכנה את גודל הגידול הראשוני הכולל הקטגורי של המטופלת.
2. הקפד להזין כהלכה בתוכנה את מצב הקשריות הקטגורי של המטופלת.
3. ודא שבלוק החימום עם המכסה המחומם, הנדרש לצורך ההכלאה, עומד בדרישות ומכיל באופן סדיר.
4. השתמש אך ורק בחומרים המתכלים שצורפו לערכת Prosigna. הם נועדו לפעול ספציפית עם תחנת ההכנה nCounter וכלי הניתוח הדיגיטלי של nCounter.
5. אם בופר ההכלאה אוסון בטמפרטורות קרות ונצפה משקע, חמם את המבחנות בטמפרטורה של 37°C עד להמסת המלחים.
6. אין לערבב בורטקס את רכיבי הבדיקה כדי לערבב, מאחר שזה עלול לפגוע בריאגנטים. הערבוב צריך להתבצע בעזרת פיפטה.
7. אין להפריד בצנטריפוגה את CodeSet לגלגלי המדווח במהירות גבוהה מ-3,000 × g למשך יותר מ-10 שניות. אין להשתמש באפשרות "pulse" (פולסים) כדי להפריד בצנטריפוגה. אפשרות זו עלולה לעבות את CodeSet.
8. אחסן את תגובות ההכלאה בטמפרטורה של 65°C עד שאלה מוכנות להעברה לתחנת ההכנה. הגדרת בלוק החימום לירידה של עד 4°C או הנחת הדגימות בקרח בסוף ההכלאה עלולות לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר בתורה עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
9. אם לא תניח את המבחנות בטמפרטורה של 65°C דקות מרגע הוספת ה-ProbeSet לגלגלי הלכידה, הדבר עלול לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר בתורה עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
10. אם לא תתחיל בעיבוד תחנת ההכנה 15 דקות מרגע הוצאת הדגימות מטמפרטורה של 65°C, הדבר עלול לגרום להכלאה מסוג Cross-hybridization, אשר בתורה עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.
11. ודא שהמכסים של המבחנות אטומים היטב לפני ההכלאה בבלוק החימום כדי למנוע התאיידות, אשר עלולה לפגוע בתוצאות הבדיקה.

6 מידע בנושא הכשרה

בדיקה זו נועדה להתבצע על-ידי מפעילים מקצועיים אשר עברו הכשרה בטכניקות מורכבות במיוחד של ביולוגיה מולקולרית, בהתבסס על תקנות מקומיות. פנה ל-Veracyte לפרטים בנושא הכשרה ספציפית לביצוע הבדיקה של Prosigna.

7 טיפול בפסולת

עין ב'מדריך למשתמש של המערכת nCounter Analysis System לקבלת מידע אודות טיפול בפסולת, שהנו ספציפי לריאגנטים ולמכשירים שנעשה בהם שימוש ביישומי IVD.

עין בערכת מיצוי ה-RNA שנבחרה הוראות לשימוש לטיפול בפסולת ופרטים ספציפיים לריאגנטים למיצוי RNA.

8 אחסון וטיפול (ריאגנטים)

תאריך התפוגה של כל רכיבי ערכת הבדיקה מופיע בתווית הברקוד המצורפת למארז CodeSet, וכן לתווית החיצונית המופיעה על גבי המארזים של כל רכיבי Prosigna.

- יש לאחסן את רכיבי המארז CodeSet של Prosigna (CodeSet לגלגלי מדווח של Prosigna, ProbeSet לגלגלי לכידה של Prosigna ודגימת ייחוס RNA לבדיקת Prosigna) בטמפרטורה של 80°C- ומטה.
- יש לאחסן את nCounter Cartridges (מחסניות nCounter) בטמפרטורה של 20°C- ומטה.
- יש לאחסן את משטחי nCounter Prep Plates (משטחי הכנה של nCounter) בטמפרטורה של 4°C (2°C-8°C).
- יש לאחסן את רכיבי חבילת nCounter Prep Plates (משטחי הכנה של nCounter) בטמפרטורת החדר, בין 15°C-25°C.

9 המכשירים הדרושים לבדיקת PROSIGNA

- מערכת nCounter Analysis System (מק"ט NCT-SYST-Dx) (כולל שני המכשירים הבאים)
 - o nCounter Prep Station 5s (מק"ט NCT-PREP-STATION) (תחנת הכנה של nCounter)
 - o nCounter Digital Analyzer 5s (מק"ט NCT-DIGITAL-ANALYZER) (כלי ניתוח דיגיטלי של nCounter)
- לקבלת מידע נוסף, עין ב'מדריך למשתמש של המערכת nCounter Analysis System.

10 ריאגנטים וציוד נדרשים, אך לא מסופקים

10.1 חומרים

1. ערכת בידוד RNA שקבועה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) (עין בסעיף 11.5 לדרישות ערכת הבידוד אם אינך משתמש בערכת הבידוד Roche FFPE או ערכת מיצוי RNA של Veracyte FFPE שנרכשה דרך Veracyte).
 2. המטוסקסילין ואאוזין (H&E)
 3. זכוכיות נושא למיקרוסקופ, בעלות מטען חיובי
 4. חומר ניקוי די-לימון (D-Limonene) (דירוג היסטולוגי)
 5. 100% אתנול (אבסולוטי), דירוג ACS או שווה-ערך (לא פחות מ-99.5%)
 6. גליצרול, דירוג ביולוגיה מולקולרית
 7. מים ללא נוקלאז, דירוג ביולוגיה מולקולרית²
 8. SDS 10%, דירוג ביולוגיה מולקולרית¹
 9. 100% איזופרופנול²
 10. צינור חרוטי 50ml²
 11. סכין גילוח (או סכין חיתוך (סקלפל) חד-פעמיים)
 12. להבי מיקרוטום חד-פעמיים
 13. מבחנות 0.5 מ"ל עם פקק הברגה¹ ומבחנות 1.5 או 1.7 מ"ל מיקרו צנטריפוגה ללא RNase עם ציפוי Nonstick
 14. קצוות חד-פעמיים (טיפים) למיקרו-פיפטות ללא RNase עם מחסום בפני אירוסול
- ¹ חומרים נדרשים אך לא מסופקים למיצוי RNA באמצעות ערכת הבידוד RNA של Roche FFPE.
- ² חומרים נדרשים אך לא סופקו למיצוי RNA באמצעות ערכת חילוף RNA של Veracyte FFPE וכן רשומים בהוראות השימוש של ערכת Veracyte.

10.2 ציוד

1. מיקרוטום
2. אמבט מים (40°C)
3. מתקן חימום לזכוכיות נושאות (45°C)
4. תבנית ייבוש לזכוכיות נושאות למיקרוסקופ
5. מיקרו-פיפטות; 2 μL, 20 μL, 200 μL ו-1000 μL
6. מיני-צנטריפוגה עם רוטור למבחנה ברצועה של 0.2 מ"ל ורוטור סטנדרטי למבחנת מיקרו-צנטריפוגה של 1.5/2.0 מ"ל
7. מיקרו-צנטריפוגה שולחני סטנדרטי עם רוטור בזווית קבועה המתאים למבחנות צנטריפוגה של 1.5 מ"ל
8. כלי צביעה מלבניים עשויים זכוכית, עם מכסים (מידות פנימיות משוערות 3.6" × 2.4" × 2.8" × 60" × 71" × 91 מ"מ); הכמות הנדרשת - 3
9. תבנית זכוכית (יכולה להכיל עד עשר זכוכיות נושא בגודל 1" × 3" × 75 מ"מ)
10. בלוק חימום יבש, ניח*
11. וורטקס שולחני למבחנות מיקרו-צנטריפוגה
12. צילינדר מדידה (גודל מומלץ: 100–250 מ"ל)
13. מחט מתקן או פינצטה לזכוכית מכסה (מכופפת, לא משוננת)
14. תרמומטרים מכילים (מכסים טווח של 55°C עד 80°C)
15. ספקטרופוטומטר למיקרו-ווליום UV/Vis (ראה מפרטים להלן)
16. בלוק חימום עם מכסה מחומם (ראה מפרטים להלן)
17. צנטריפוגה עם מתאם מיקרו פלטה (ראה מפרטים להלן)
18. מיכל עגול לצביעת זכוכית נושא Coplin

* ציוד הנדרש למיצוי RNA עם ערכת בידוד RNA של Roche FFPE וערכת מיצוי RNA של Veracyte FFPE.

10.3 מפרטי ציוד

טבלה 1: ספקטרופוטומטר למיקרו-ווליום UV/Vis לניתוח כמות של חומצת גרעין, ספקטרום מלא

מרכיב עיצוב	מפרטים
טווח היקף הדגימה	1-2 μL
אורך נתיב	1 מ"מ
טווח אורך גל	260-280 nm
דיוק או שגיאה של אורך גל	± 1 nm
רזולוציה או רוחב פס של מכשיר מדידה ספקטרלי	קטן מ-4 nm או שווה ל-4 nm
דיוק של יכולת ספיגה או שגיאה פוטומטרית	0.003 (נתיב 1 מ"מ)
אקראיות	
מגבלה של זיהוי	5 ng/μL RNA
ריכוז מרבי	≥ 1000 ng/μL RNA

טבלה 2: ספקטרופוטומטר למיקרו-ווליום פוטודיודה UV-Vis לניתוח כמות של חומצת גרעין

מרכיב עיצוב	מפרטים
טווח היקף הדגימה	1-2 μL
אורך נתיב	0.5 מ"מ
טווח אורך גל	260 nm-280 nm
רזולוציה של מכשיר מדידה ספקטרלי	קטן מ-8 nm או שווה ל-8 nm
דיוק של יכולת ספיגה	3% (ב-1.05 Abs ב-260 nm)
מגבלה של זיהוי	4 ng/μL RNA
ריכוז מרבי	≥ 1000 ng/μL RNA

מרכיב עיצוב	מפרטים
עיצוב של בלוק החימום	• נדרשת התאמה לפרופיל רגיל, מבחנות מסומנות (keyed) ברצועה 12×0.2 מ"ל המספוקות כחלק מחבילת ההכנה של nCounter.
	• בלוקי חימום המיועדים למבחנות פרופיל נמוך (LP) ופרופיל גבוה (HP) אינם מתאימים (מכונים גם בלוקים "מהירים" לתרמוסטירקולציה)
	• בלוקי חימום המיועדים לסוגים אחרים של מבחנות (לדוגמה, מבחנות 0.1 מ"ל, מבחנות 1.5 מ"ל) אינם מתאימים
	• נדרשת אפשרות תכנות לעמידה בטמפרטורה של 65°C נדרשת עמידה בטמפרטורות של $1^{\circ}\text{C} \pm$ מתוך 65°C
עיצוב של המכסה המחומם	• ניתן להשתמש במכסים בעלי גובה קבוע או מתכוונן
	• נדרש תכנות של המכסה ל- 70°C

טבלה 4: צנטריפוגה עם נשא מיקרו פלטה לסיבוב nCounter Prep Plates (משטחי הכנה של nCounter)

מרכיב עיצוב	מפרטים
מהירות סרכז	מינימום $2000 \times g$
רוטורים	4 רוטורים מסתובבים $\times 750$ מ"ל עם מחזיקי פלטה (או מקבילה אחרת) כדי להתאים לפלטות בעלות 96 שקעים בתבנית SBS
מצבים	מצבי אצה/האטה

11 איסוף ועיבוד הדגימות

11.1 דרישות דגימות הרקמה וסקירה פתולוגית

- יש לבצע את בדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי בדגימה של רקמת סרטן שד בעל גידולי קולטן הורמון חיובי שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE), המסוגלת על-ידי פתולוג כרקמה נגועה בסרטן שד פולשני השייכת לאחד הסוגים הבאים:
 - קרצינומה דוקטלית פולשנית
 - קרצינומה לובולרית פולשנית
 - קרצינומה פולשנית עם מאפיינים דוקטליים ולובולריים ("קרצינומה מעורבת")
 - NST (סוג שאינו ספציפי) או NOS (סוג לא מובחן)
- לצורך הבדיקה, על הפתולוג לבחור את בלוק הגידול שקובע בפורמלין ונשמר בתוך פרפין (FFPE) הכולל את האזור הגדול ביותר של סרטן שד פולשני חי (viable).
 - הבדיקה דורשת קטעי רקמה על-גבי זכוכית לא צבועה לצורך עיבוד, וזכוכית מקבילה צבועה ב-H&E מבלוק הגידול שקובע בפורמלין ונשמר בתוך פרפין (FFPE).
 - מומלץ שחיתוך קטעי הרקמה המיועדים לעיבוד הבדיקה יתבצע ברצף מיד לאחר קטע הרקמה הנחתך לצביעה ב-H&E כדי להבטיח שאזור הגידול המזוהה בזכוכית הצבועה ב-H&E מייצג את אזור הגידול בזכוכית שאין צבועות.
 - על הפתולוג לסמן בעיגול את סרטן השד הפולשני החי על גבי זכוכית ה-H&E, למטע הרקמה הסמוכה שאינה סרטנית.
 - הפתולוג או טכנאי מעבדה מיומן נדרשים להעריך את תאיות הגידול ואת אזור שטח הפנים של הגידול בתוך האזור המסומן בעיגול של הזכוכית הצבועה ב-H&E.
 - אחוז תאיות הגידול בזכוכית הצבועה ב-H&E חייב להיות $\leq 10\%$
 - אזור שטח הפנים של הגידול, המסומן בעיגול, בזכוכית הצבועה ב-H&E חייב להיות ≥ 4 מ"מ²
 - *שים לב שאחוז תאיות הגידול מתייחס לאחוז תאי הגידול החיים בתוך אזור הגידול המסומן בעיגול.
 - להזנת קלט בבדיקה מומלץ להשתמש באזור שטח פנים כולל של הגידול שהנו גדול מ-100 מ"מ². הטבלה הבאה ממחישה את מספר זכוכיות הנושא המומלץ בהתבסס על אזור שטח הפנים הנמדד של הגידול בזכוכית הצבועה ב-H&E.
 - אם, בתהליך בדיקת הרקמה, יתגלה כי בלוק הגידול כולל אזור גידול בלתי מספק או תאיות בלתי מספקות של הגידול, ניתן לבצע הערכה של בלוק אחר הלקוח מאותו גידול. אם לא קיימים בלוקים של פרפין (FFPE) המכילים רקמת גידול מספקת, אין לבצע את הבדיקה של Prosigna. שים לב שכאשר מדובר בגידולים שאזור שטח הפנים שלהם קטן מ-20 מ"מ², סביר יותר שדרישות הזנת ה-RNA לא ייענו.

טבלה 5: דרישות מומלצות לזכוכיות נושא בהתבסס על אזור שטח הפנים של הגידול

אזור שטח פנים נמדד של הגידול בזכוכית הצבועה ב-H&E (מ"מ ²)	מספר זכוכיות הנושא הלא צבועות
19-4	6
99-20	3
≤ 100	1

11.2 איסוף ואחסון הדגימות

- ניתן לבצע את הפעולה המתוארת להלן בהתאם לנוהלי הפעולה הרגילים של המעבדה: איסוף הרקמה וקביעה בפורמלין, טיפול בבלוק הגידול שקובע בפורמלין ונשמר בתוך פרפין (FFPE) ואחסון, והעברת רקמת ה-FFPE על גבי זכוכית נושאית.
- יש לאחסן את קטעי הרקמה שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) שעל-גבי הזכוכית בהתאם לנוהלי הפעולה הרגילים של המעבדה. כאשר מדובר באחסון לפרקי זמן ארוכים יותר (< 30 ימים), יש לאחסן את זכוכיות הנושא בסביבה יבשה ולעבד אותן תוך פרק זמן של עד 9 חודשים כדי להבטיח את איכות תוצאות הבדיקה.

11.3 הכנה של זכוכיות הנושא

- באמצעות מיקרוטום, יש לחתוך קטע עבה בגודל 4-5 מ"מ לצביעה ב-H&E.
- באמצעות מיקרוטום, חתוך קטעים עבים של חמ 10 לשימוש בבדיקה של Prosigna.
- הצף את הקטעים באמבט מים בטמפרטורה של 40°C .
- הנח את הקטעים על גבי זכוכיות נושא למיקרוסקופ בעלות מטען חיובי.
- הנח לזכוכיות להתייבש.
- הכנס את הזכוכיות לתנור למשך הלילה בטמפרטורה של 45°C .

11.4 עיבוד של זכוכיות הנושא

- הכן תמיסת עבודה המכילה גליצרול בריכוז 3% על-ידי ערבוב 1.5 מ"ל גליצרול עם 48.5 מ"ל מים ללא נוזלאז בדירוג מולקולרי; דרג לפי מידת הרלוונטיות. מזוג את התמיסה למיכל Coplin לטיפול בזכוכיות הנושא.
- מזוג כמות של כ-200 עד 250 מ"ל של חומר ניקוי D-Limonene לשני מיכלי צביעה, וודא שזכוכיות הנושא טבולות באופן מלא בתבנית לאחסון הזכוכיות.
- מזוג כמות של כ-200-250 מ"ל של אתנול אבסולוטי (EtOH) למיכל צביעה שלישי.
- הנח את קטעי הרקמות הלא צבועות שעל-גבי הזכוכיות בתבנית לאחסון זכוכיות נושא.
- הנח את תבנית זכוכיות הנושא במיכל הצביעה הראשון של ה-D-Limonene ונער אותה בעדינות לפנים ולאחור למשך 10 עד 15 שניות. השאר את התבנית במיכל הצביעה הראשון של ה-D-Limonene למשך 2 דקות.
- העבר את התבנית ממכל הצביעה הראשון של ה-D-Limonene למיכל השני של ה-D-Limonene. נער בעדינות את התבנית לפנים ולאחור למשך 10 עד 15 שניות. השאר את התבנית במיכל הצביעה השני של ה-D-Limonene למשך 2 דקות. הקפד להוציא את כל הפרפין; אחרת, השאר את התבנית במיכל הצביעה השני של ה-D-Limonene למשך כדקה נוספת.
- העבר את התבנית ממכל הצביעה השני של ה-D-Limonene לשיטית ה-EtOH. נער בעדינות את התבנית לפנים ולאחור למשך 10-15 שניות והוצא אותה לאחר 2 דקות.
- הנח לזכוכיות הנושא להתייבש למשך 5-10 דקות או עד לייבוש מלא, והרקמה יתייבש בלבן (הפעולה עשויה להימשך זמן רב יותר, תלוי בגודל הרקמה).
- סמן את אזור הרקמה על החלק האחורי של הזכוכיות הלא צבועות על-ידי יישור כנגד הזכוכיות הצבועה של ה-H&E בהתאמה, וטרנספוזיציה של האזור המסומן.
- בצע רה-הידרציה של הרקמה, זכוכית אחת בכל פעם, בזכוכית המסומנת הלא צבועה על-ידי טבילת הזכוכית בתמיסת הגליצרול 3%.
- הסר את הגליצרול המיותר מהזכוכית עם רקמה מהמעבדה.
- בזמן עיבוד של זכוכיות מרובות, המשתמש יכול לאפשר לזכוכיות להתייבש על מעמד ייבוש במהלך רה-הידרציה של הזכוכיות האחרות.
- הסר באמצעות סכין גילוח או סכין סקלפל כל רקמה שאינה רקמת גידול מסביב לאזור הגידול המסומן, והשלך אותה.
- תוך החזקת קצה אחד של הזכוכית והנחת הקצה האחר שלה על משטח יציב בזווית של 45 מעלות, אסוף את רקמת הגידול שביצעת בה מאקר-דיסקציה לקצה של סכין הגילוח. הרקמה אמורה "להסתלסל" בקלות על גבי סכין הגילוח בזמן האיסוף שלה.
- חזור על השלב הקודם עבור כל זכוכית מאותה דגימה.
- הערה:** ניתן לאסוף כמה זכוכיות לא צבועות, השייכות לאותה דגימת FFPE, לאותו סכין גילוח.
- החלק בעדינות את קטעי הרקמה מאותה דגימה למבחנת מיקרו-צנטריפוגה מסומנת של 1.5 מ"מ².
- במידה והשתמש בהן, שטוף את מחט המתקן או הפינטה על-ידי טבילתן ב-D-Limonene למשך כמה שניות וייבושן בין דגימות הרקמה.

Veracyte ממליצה להשתמש בערכת הבידוד של Roche FFPET RNA או בערכת Veracyte FFPE RNA Extraction, אשר אושרו במיוחד לשימוש עם Prosigna.

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

טבלה 6: מפרטים של ערכות בידוד RNA

מטרי	בדיקה או מדידה	מפרט
ריכוז RNA	צפיפות אופטית ב-260 nm	$\geq 12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
נפח כולל של RNA (μL)	נפח אלוציה כולל	$\geq 12 \mu\text{L}$
טווח ה-RNA	יחס של צפיפות אופטית ב-260 nm לצפיפות אופטית ב-280 nm (OD 260/280 nm)	2.3-1.7
זיהום דנ"א	תוכן דנ"א גנומי של דגימת RNA שעברה השטפה (אלוציה)	$\leq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$
שלמות ה-RNA	חלוקת גודל של שברי ה-RNA המבודד	$\geq 90\%$ משברי ה-RNA המבודד חייבים להיות באורך > 100 נוקלאוטידים

זהירות: אם נעשה שימוש בהליך בידוד חלופי בשילוב עם מבחן Prosigna, זרימת עבודה מסוימת זו חייבת לעבור אימות מלא על ידי המעבדה לפני יישום בשגרה.

הליך בידוד ה-RNA:

- אם נעשה שימוש בערכת בידוד RNA של Roche FFPET, עקוב אחר ההוראות הספציפיות לבידוד של RNA המתוארות להלן.
- אם נעשה שימוש בערכת חילוץ RNA של Veracyte FFPE, עקוב אחר הוראות השימוש כפי שסופקו על ידי Veracyte ולאחר מכן המשך לסעיף 11.6.
- אם נעשה שימוש בשיטת מיצוי חלופית, עקוב אחר הפרוטוקול או הפרוטוקול המאושרים שניתנו על ידי היצרן, ולאחר מכן המשך לסעיף 11.6.

כל חבילת ערכת מיצוי RNA המיוצרת על ידי Roche או על ידי Veracyte מוסמכת לייצר דגימות RNA העומדות במפרטים מוגדרים מראש עבור מבחני ביטוי גנים אבחנתיים. אנא עיין בגיליון שיטת ערכת מיצוי ה-RNA שנבחר / הוראות שימוש לקבלת הוראות אחסון, בטיחות וטיפול מתאימות.

הכנה של תמיסות העבודה עבור ערכת Roche FFPET RNA Isolation

- הכן תמיסות עבודה לפני שתמשיך בתהליכי עיכול רקמה ובידוד ה-RNA:

הכנה של תמיסות העבודה	
ריאגנט	הליך
בופר שטיפה I (WB1)*	הוסף 15 מ"ל 100% אתנול, אחסן את ה-WB1 המוכן בטמפרטורה של +15 עד 25°C .
בופר שטיפה II (WB2)*	הוסף 80 מ"ל 100% אתנול, אחסן את ה-WB2 המוכן בטמפרטורה של +15 עד 25°C .
פרוטאינז K (PK)	המס את הפרוטאינז K המיובש ב-4.5 מ"ל של בופר הכנת ריאגנט (RPB).
DNase I (DNase I)*	המס את ה-DNase I המיובש ב-740 μL של בופר הכנת ריאגנט (RPB).
	הכן מנות קטנות (aliquots) של 50 μL מן ואחסן אותן בטמפרטורה של -15 עד 25°C .

הערה: פריטים המסומנים בכוכבית (*) אינם נדרשים עד לאחר עיכול הרקמה.

עיכול הרקמה עבור ערכת Roche FFPET RNA Isolation

- הפשר מספיק מנות קטנות של פרוטאינז (PK). לאחר ההפשרה, אחסן את המנות הקטנות על קרח עד לשימוש.
- הערה: מנה קטנה אחת של PK 600 μL מכילה מספיק פרוטאינז K ל-4 עיכולי רקמה.
- הוסף 100 μL של בופר פירוק רקמה (TLB), 16 μL של SDS 10% ו-120 μL של תמיסת עבודה פרוטאינז K למבחנות הדגימה הכוללות רקמה.
- ערבל בוורטקס את מבחנות הדגימה הכוללות רקמה למשך כמה שניות וסרכז (spin down) אותן לזמן קצר.
- הכנס לאינקובטור למשך הלילה בטמפרטורה של 55°C (12 - 23 שעות).

- בדוק בעין את מבחנות הדגימה כדי לקבוע אם הרקמה עולה במלואה. עיכול מלא ייראה צלול ויכלול מעט רקמה, אם בכלל, בתמיסה.
- אם העיכול הסתיים, המשך לשלב הבא.
- אם העיכול לא הסתיים, הוסף 20 μL נוספים של פרוטאינז K והכנס לאינקובטור לשעה נוספת.
- סרכז לזמן קצר את כל הדגימות (> 30 שניות במיני-צנטריפוגה).
- הכנס את הדגימות לאינקובטור בטמפרטורה של 80°C למשך 15 דקות.
- הכן או הפשר מספיק מנות קטנות (aliquots) של DNase. לאחר ההפשרה, אחסן את המנות הקטנות על קרח עד לשימוש.
- הערה: מנה קטנה אחת של DNase 50 μL מכילה מספיק DNase ל-4 בידודי RNA. מהלך את ה-DNase בבופר אינקובציה של DNase (DIB).
- ל-N (מספר) של בידודי RNA היא: $90 \times (N+1) \mu\text{L}$ של בופר אינקובציה של DNase + $10 \mu\text{L}$ (N+1) DNase. אחסן את תמיסת ה-DNase המדוללת על קרח עד לשימוש.
- הוסף 325 μL של בופר קשירת פרפין (PBB) ו-325 μL של אתנול אבסולוטי לכל דגימה וערבב בעזרת פיפטטה.
- סרכז לזמן קצר (> 30 שניות במיני-צנטריפוגה).
- הכנס מבחנת סינון מסוג High Pure Filter למבחנת איסוף מסוג High Pure Collection.
- העבר בעזרת פיפטטה את הדגימה למיכל העליון של מבחנת הסינון, והימנע מהעברה של שאריות רקמה.
- הפרד בצנטריפוגה למשך 30 שניות ב- $g \times 6,000$.
- הנח מבחנת סינון מסוג High Pure Filter על מבחנת איסוף חדשה מסוג High Pure Collection (השלך את מבחנת האיסוף הקודמת המכילה את החומר הנשטף).
- הפרד בצנטריפוגה למשך 2 דקות ב- $g \times 16,000$ כדי לייבש לחלוטין את הפליס של המסנן.
- הנח מבחנת סינון מסוג High Pure Filter על מבחנת איסוף חדשה מסוג High Pure Collection (השלך את מבחנת האיסוף הקודמת המכילה את החומר הנשטף).
- הוסף 100 μL של תמיסת DNase מדוללת לפליס המסנן של מבחנת הסינון מסוג High Pure Filter והכנס לאינקובטור למשך 15 דקות בטמפרטורה של +15 עד 25°C .
- הוסף 500 μL של תמיסת העבודה בופר שטיפה I (WB1) לפליס של המסנן High Pure Filter, והפרד בצנטריפוגה למשך 20-30 שניות ב- $g \times 6,000$, השלך החומר הנשטף.
- הוסף 500 μL של תמיסת העבודה בופר שטיפה II (WB2) לפליס של המסנן High Pure Filter, והפרד בצנטריפוגה למשך 20-30 שניות ב- $g \times 6,000$, השלך את החומר הנשטף.
- הוסף 500 μL של תמיסת העבודה בופר שטיפה II (WB2) לפליס של המסנן High Pure Filter, והפרד בצנטריפוגה למשך 20-30 שניות ב- $g \times 6,000$, השלך את החומר הנשטף.
- הפרד בצנטריפוגה למשך 2 דקות ב- $g \times 16,000$ כדי לייבש לחלוטין את הפליס של המסנן.
- הנח את מבחנת הסינון מסוג High Pure Filter במבחנת מיקר-צנטריפוגה מסומנת, ללא RNase, של 1.5 או 1.7 מ"ל.
- הוסף 30 μL של בופר אלוציה (EB) למרכז הפליס של המסנן High Pure Filter.
- הכנס לאינקובטור למשך 1 דקה בטמפרטורה של +15 עד 25°C .
- הפרד בצנטריפוגה למשך 1 דקה ב- $g \times 6,000$ כדי לבצע השטפה (אלוציה) של ה-RNA מהמעמוד. הוצא את מבחנת הסינון מסוג High Pure Filter והשלך אותה.
- הפרד בצנטריפוגה את ה-RNA שעבר השטפה (אלוציה) במבחנת המיקר-צנטריפוגה למשך 2 דקות במהירות מרבית.
- העבר את הנוזל העליון (supernatant) למבחנה עם פקק מתברג 0.5 מ"ל מבלי להפריע לסיבי זכוכית שיתכן שנשטפו מהפליס של המסנן בתחתית המבחנה המקורית.

11.6 מדידת הריכוז והאיכות של ה-RNA

- מדוד את הריכוז של ה-RNA המבודד באותו יום עבודה (אחסן בטמפרטורה של +2 עד 8°C) או הקפא בטמפרטורה של -70°C ומטה עד לשימוש.
- מדוד את הצפיפות האופטית (OD) ביחידות 260 ו-280 של 2 μL של ה-RNA המבודד באמצעות ספקטרופוטומטר העומד בדרישות המפרטים המוגדרים שצוינו בסעיף 10.3 'מפרטי ציוד'. אל תעביר בעזרת פיפטטה את הנפח 2 μL מתחתית מבחנת המקור, אם נותרו סיבי זכוכית - הדבר עלול להפריע לקריאה של הצפיפות האופטית.
- מלא אחר הוראות היצרן של הספקטרופוטומטר למדידת ה-RNA.
- אם דגימה כלשהי אינה עומדת במדדי הטוהר או הריכוז המינימליים של ה-RNA (טבלה 6), הפרד בצנטריפוגה את מבחנת הדגימה למשך 1 דקה במהירות מרבית ($g \times 10,000$), הנח את המבחנה על קרח וחזור על תהליך המדידה. אם הדגימה עדיין לא עומדת במדדי הטוהר או הריכוז, דגימת ה-RNA אינה מתאימה לניתוח במסגרת הליך הבדיקה של Prosigna. אין להשתמש באיכות או בכמות לא מספקת של RNA בבדיקה של Prosigna.

5. ניתן לחזור על מיצוי ה-RNA אם הוא אינו עומד במפרטי הריכוז או הטווח המינימליים (טבלה 6). המשתמשים יכולים לבחור לבדוד זכוכיות נוספות מאותו בלוק FFPE או לבחור בלוק נפרד מאותה מטופלת.
6. אם ריכוז ה-RNA עולה על $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ יש לדלל אותו עם מים נטולי RNase ו-DNase בדירוג מולקולרי, לריכוז מטרה של $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ לפני ביצוע בדיקת ההכלאה במודר הזרם (Downstream). השתמש בתוצאה הרשומה של יחס הצפיפות האופטית (OD) 260/280 מהדגימה הלא מדוללת כדי לקבוע אם הדגימה המדוללת עומדת בטווח RNA מינימלי של 1.7.
7. הקפא את ה-RNA בטמפרטורה של -70°C ומטה אם לא ניתן לסיים את הבדיקה של Prosigna באותו יום עבודה.

11.7 הליך הבדיקה

הליך הבדיקה מתאר את השלבים הנוחים לביצוע הבדיקה של Prosigna באמצעות מערכת nCounter Analysis System. ניתן לסכם שלבים אלה בקטגוריות הבאות ביומיים רצופים:

היום הראשון

- הגדרת 'מזהה ערכת הרצה' (RSID) ביישום המקוון
- הגדרה של הכלאת RNA בעזרת CodeSet של Prosigna (הגדרה בת 30 דקות, ההכלאה בת 15–21 שעות)

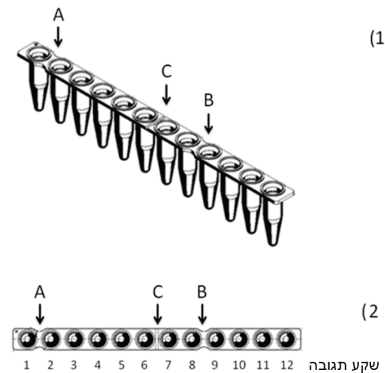
היום השני

- הגדרה והרצה של תחנת ההכנה (20 דקות להגדרה, 2–3 שעות להרצה, בהתאם למספר הדגימות שאתה מריץ)
- הגדרה וסריקה של המחשנית בכלי הניתוח הדיגיטלי (5 דקות להגדרה, 2.5–4.5 שעות לכל מחשנית, בהתאם למספר הדגימות שאתה מריץ)
- אחזור דוח (30 דקות)

בחירת דגימות של מטופלות והגדרת האצווה

1. קבע אילו דגימות של המטופלת יהיו חלק מהרצת המבחן. באצווה יחידה ניתן לכלול עד 10 דגימות
 - א. לכל דגימה באצווה יוקצה מקום ייחודי ברצועה המכילה 12 מבחנות המשמשת להכלאה, הנרשמת כחלק ממזהה ערכת ההרצה במכשיר ('מזהה ערכת הרצה' מבוצע דרך תוכנה של יישום מקוון). שים לב שמקומות 1 ו-2 שמורים לדגימת הייחוס, ומקומות 3–12 שמורים לדגימות RNA של גידול.
 - ב. האיור למטה מציג מבט מהצד (1) ותצוגות מלמעלה (2) של המבחנה ברצועה. המבחנות ברצועה מסומנות באופן א-סימטרי בין שקעי התגובה 1 ו-2 (A) ו-8 ו-9 (B) כדי לשמור על סדר הדגימות במהלך העיבוד. המבחנות ברצועה גם מחורצות בין שקעי התגובה 6 ו-7 (C) כדי להקל עליך את חיתוך המבחנה במידה ויש צורך להתאים מתאמי צנטריפוגה סטנדרטיים.

איור 6: איור של מבחנות מסומנות (keyed) ברצועה



2. חשב את כמות ה-RNA והמים (במידת הצורך) שיש להוסיף לתגובת ההכלאה עבור כל דגימה בתוך האצווה.
 - א. קלט ה-RNA המומלץ הוא 250 ng עבור הבדיקה. טווח קלט ה-RNA המקובל להכלאה הוא $125\text{--}500 \text{ ng}$.
 - ב. חשב את הנפח (במיקרוליטרים) של דגימת ה-RNA שיש להוסיף לתגובת ההכלאה על-ידי חילוק קלט הדגימה הרצויה (לדוגמה, 250 ng) בריכוז הנמדד.

- ג. אם הריכוז המחושב של הדגימה הוא בטווח שבין $12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ל- $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$, הוסיף את הנפח המרבי של $10 \mu\text{L}$.
 - ד. בדגימות הדורשות פחות מ- $10 \mu\text{L}$, חשב את נפח המים הנדרש כדי ליצור נפח דגימה כולל של $10 \mu\text{L}$.
- דוגמה:** בדגימה בעלת ריכוז RNA נמדד של $85 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $2.9 \mu\text{L}$ מהדגימה נדרשים למסה כוללת של 250 ng ו- $7.1 \mu\text{L}$ מים נדרשים כדי ליצור נפח של $10 \mu\text{L}$ לפני הוספת הריאגנטים הנוותרים. במשוואה: $250 \text{ ng} + 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2.9 \mu\text{L}$

רישום ועיבוד הדגימה

המשתמש יצור 'מזהה ערכת הרצה' ייחודי עבור כל אצווה של דגימות, תוך שיוך מזהי הדגימה למיקום המבחנה ברצועה (מקומות 3–12) בעזרת היישום המקוון nCounter Analysis System Services. המשתמש יכול לעיין ב'מדריך למשתמש' לקבלת הוראות לגבי השימוש ביישום המקוון nCounter Analysis System Services.

1. אם ה-RNA היה קפוא לפני השימוש, בצע את השלבים הבאים לפני שתמשיך:
 - א. הפשר את דגימות ה-RNA הפשרה מלאה ואחסן אותן על קרח.
 - ב. הפרד בצנטריפוגה את מבחנת הדגימה שהופשרה למשך 1 דקה במהירות מרבית ($10,000 \times g$) והנח שוב על קרח.
 2. בחר את הגודל המתאים של ערכת הבדיקה של Prosigna בהתבסס על מספר הדגימות הנבדקות של המטופלות (1, 2, 3, 4 או 10). הוצא מהמקפיא בטמפרטורה -80°C מבחנה המכילה כל אחד מהריאגנטים הבאים של ערכת CodeSet להפשרה. אחסן את הריאגנטים על קרח אם אינך ממשיך מיד בביצוע השלבים הבאים.
 - א. CodeSet לגלאי מדווח של Prosigna (מדבקה ירוקה על הפקק)
 - ב. ProbeSet לגלאי לכידה של Prosigna (מדבקה אפורה על הפקק)
 - ג. דגימת ייחוס של Prosigna (ללא מדבקה על הפקק)
 3. הסר את מדבקת הברקוד של מנת ה-CodeSet והוצא קוד תצורת בדיקה ממאזר ה-CodeSet.
 4. באמצעות דפדפן אינטרנט, היכנס אל היישום המקוון nCounter IVD Analysis System ובחר את Prosigna כסוג הבדיקה כדי להתחיל להגדיר את טופסי הרישום הדיגיטלי.
 5. בדף הראשי בחר באפשרות 'צור ערכת הרצה חדשה'.
 6. השדה הנדרש הראשון בהגדרה של הרצת Prosigna הוא Run Set ID (מזהה ערכת הרצה). הזן מזהה ייחודי בשדה Run Set ID (מזהה ערכת הרצה) כדי לזהות את האצווה של הדגימות.
 7. סרוק או הזן באופן ידני את קוד תצורת הבדיקה ביישום המקוון. לאחר הסריקה או ההזנה, ניתן להשליך אותו.
 8. סרוק או הזן באופן ידני את מספר ערכת ה-CodeSet ביישום המקוון.
 9. לאחר מכן, הזן את מזהה הדגימה הייחודי עבור הדגימה אשר תמוקם במקום/בשקע השלישי של רצועת המבחנות בשדה מזהה הדגימה המתאים.
 - א. הזן את מזהי דגימות ה-RNA של המטופלות באמצעות סרוק ברקודים או באופן ידני על-ידי הזנת מזהי הדגימות בעזרת מקלדת.
 - ב. לאחר הזנה של כל מזהה דגימה, עבור באמצעות Tab למילוי השדות הנפתחים הנדרשים (גודל כולל של הגידול ומצב הקשריות) עבור הדגימה לפני הזנת הדגימה הבאה.
 - i. השתמש במספר הקשריות הנגועות שהתגלה במהלך ההערכה הפתולוגית של המטופלת כדי לבחור את קטגוריית הקשריות המתאים עבור הבדיקה (אפס, 1–3, ≥ 4).
 - ii. השתמש בגודל הגידול הכולל שנמדד או בשלב שהתגלה במהלך ההערכה הפתולוגית של המטופלת כדי לבחור את קטגוריית גודל הגידול הכולל המתאים עבור הבדיקה (≥ 2 ס"מ או < 2 ס"מ).
 - ג. ניתן להזין הערות בשדה האופציונלי Memo (תזכיר) עבור כל דגימה.
- הערה:** אם לא נדרשים מקומות/שקעים כלשהם ברצועת המבחנות, השאר את השדות הנוותרים ריקים. אם נדרשים שדות נוספים לדגימות נוספות, השתמש בתצורת בדיקה אחרת המתאימה למספר רב יותר של דגימות.
10. לאחר השלמת הזנת הדגימה, ציין אילו משתמשים יקבלו את המידע הבא:
 - א. עדכוני מצב עבור ההרצות 'תחנת הכנה' ו'כלי ניתוח דיגיטלי'.
 - ב. הודעה שהדוח הסופי זמין.
 11. שמור את ערכת ההרצה שהושלמה.
 - א. ניתן להדפיס את גיליון העבודה של ערכת ההרצה, ולהשתמש בו לשם מעקב אחר הדגימה ולמטרות אימות.

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

הערה: אין להשתמש ב-CodeSet לגלאי המדווח בצנטריפוגה במהירות גבוהה מ- $3,000 \times g$ או למשך יותר מ-10 שניות, ואין להשתמש באפשרות "pulse" (פולסים) אם תעשה זאת, הצנטריפוגה עלולה להגיע למהירות מרבית ולהפריד את ה-CodeSet מחוץ לתמיסה.

1. תכנת את בלוק החימום לפי נפח $30 \mu\text{L}$, טמפרטורה מחושבת של הבלוק ושל המכסה והגדרת הזמן לאפשרות "forever" (תמיד) (או מקבילה שוות ערך ל-"hold" (השהה)). הגדר את הטמפרטורה של בלוק החימום ל- 65°C והגדר את המכסה המחומום לטמפרטורה של 70°C .

הערה: בשלבים הבאים, חשוב ביותר לשמור על הסדר שבו הדגימות נוספות למבחנות הרצועה, ולהקפיד על כך שהוא זהה לסדר המופיע ב'מזהה ערכת ההרצה'.

2. סמן בתוויות את המבחנות המסומנות (keyed) ברצועה בעלת 12 השקעים כדי להבחין בין מקומות 1-6 לבין מקומות 12-7 (ראה איור של המבחנות ברצועה).

3. במידת הצורך, חצה את המבחנה לשניים כך שתתאים למיני-צנטריפוגה עם מתאם של מבחנות ברצועה.

4. העבר בפיפטה $10 \mu\text{L}$ של דגימת הייחוס למקומות 1 ו-2 של המבחנות המסומנות (keyed) ברצועה.

5. העבר בפיפטה את הנפח המחושב של המים הנדרש עבור כל דגימה למקומות המתאימים במבחנות המסומנות (keyed) ברצועה.

6. העבר בפיפטה את הנפח המחושב של ה-RNA הנדרש עבור כל דגימה למקום המתאים במבחנות המסומנות (keyed) ברצועה, בעזרת קצה (טיפ) חדש של פיפטה עבור כל דגימה.

7. לאחר ההוספה של דגימת המינרל למבחנה ברצועה, מומלץ להניח את המבחנה במעמד המיועד למבחנות דגימה, לשם שמירה על הסדר שבו הדגימה נוספה למבחנה. פעולה זו נועדה להבטיח שהדגימות נוספו בסדר המכוון לאחר הוספה של כל הדגימות למבחנות ברצועה.

8. לאחר הוספת כל הדגימות למבחנות ברצועה, ודא שסדר הדגימות נשמר ברצועות המבחנות (ניתן להשתמש בגיליון העבודה של ערכת ההרצה לאימות סדר הדגימות).

א. במידת הצורך, ערוך את 'מזהה ערכת ההרצה' בעזרת תוכנת היישום המקוון כך שישקף את סדר הדגימות בפריסה הסופית (עיין ב'מדריך למשתמש של המערכת nCounter Analysis System' לקבלת הוראות לעריכת 'מזהה ערכת הרצה' קיים).

9. לאחר אימות סדר הדגימות, הנח שוב את מבחנות דגימת ה-RNA הבדודות על קרח.

10. צור תמהיל ראשי המכיל $130 \mu\text{L}$ של בופר ההכלאה ו- $65 \mu\text{L}$ של ה-CodeSet לגלאי המדווח.

הערה: אם ה-CodeSet לגלאי המדווח אוסון בקרח, אפשר לו להגיע לטמפרטורת החדר למשך 1 דקה לפני הוספת בופר ההכלאה.

11. ערבב בעזרת פיפטה וסרכז את התמהיל הראשי לזמן קצר.

הערה: אין להוסיף את ה-ProbeSet לגלאי לכידה לתמהיל הראשי ואין לאחסן את התמהיל הראשי הסופי בקרח.

12. העבר בעזרת פיפטה $15 \mu\text{L}$ מהתמהיל הראשי לכל אחד מ-12 השקעים. השתמש בפיפטה חדשה לכל שקע.

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

13. הוסיף $5 \mu\text{L}$ של ה-ProbeSet לגלאי לכידה לכל אחד מהשקעים, בעזרת טיפ חדש של פיפטה עבור כל שקע.

14. כסה את שקעי המבחנה וערבב את הריאגנטים על-ידי הפיכת המבחנות כמה פעמים ומכה קלה באצבע כדי להבטיח ערבוב מלא.

15. סרכז לזמן קצר את הדגימות במבחנות הרצועה בצנטריפוגה מסוג Picofuge או מיני-צנטריפוגה ($g \times 3000 <$).

הערה: השתמש ב-Picofuge שמסוגלת להכיל מבחנות ברצועה בעלת 12 שקעים, או במידת הצורך מיני-צנטריפוגה שמסוגלת להכיל מבחנות חתונות ברצועה.

16. הנח את המבחנות בבלוק חימום בטמפרטורה של 65°C עם מכסה מחומם. הכנס לאינקובטור את בדיקות ההכלאה בטמפרטורה של 65°C למשך 15–21 שעות. יש להשאיר את ההכלאות בטמפרטורה של 65°C עד שהן מוכנות לעיבוד בתחנת ההכנה.

הערה: השלך ה-CodeSet שלא נעשה בו שימוש.

עיבוד הדגימות בתחנת ההכנה של nCounter

1. אתר את תחנת ההכנה המשוכנת לכלי הניתוח הדיגיטלי.

2. הוצא את מחסנית ה-nCounter מאחסון בטמפרטורה של -20°C ואפשר לה להגיע לטמפרטורת החדר למשך 10–15 דקות בשקית האלומיניום.

הערה: הקפד להשתמש יחד ברכיבים השייכים לאותה מנה של ערכות.

3. כאשר המחסנית מגיעה לטמפרטורת החדר הוצא אותה משקית האלומיניום לפני הנחת המחסנית על גבי משטח תחנת ההכנה.

4. הוצא את משטחי ההכנה של nCounter מאחסון בטמפרטורה של 4°C ואפשר להם להגיע לטמפרטורת החדר למשך 10–15 דקות.

הערה: משטח הכנה אחד בלבד נדרש להרצות המבוצעות באמצעות ערכת Prosigna המכילה 1, 2, 3 או 4 בדיקות.

5. הפרד בצנטריפוגה את משטחי ההכנה ב- $g \times 2000$ למשך 2 דקות כדי לאסוף את הנוזלים בתחתית המשקעים לפני הנחת משטחי ההכנה על גבי משטח תחנת ההכנה.

6. בזמן שהמחסניות והמשטחים מגיעים לטמפרטורת החדר, הכן את תחנת ההכנה עם החומרים המתכלים של חבילת ההכנה של nCounter.

7. באמצעות ממשק מסך המגע של תחנת ההכנה של nCounter, בחר את הלחצן "Diagnostics" (דיאגנוסטיקה) עבור הבדיקה שלך.

8. תחת מסך התפריט הראשי, בחר בלחצן "Process Samples" (עבד דגימות) בממשק של מסך המגע.

9. עיין ברשימת 'מזהה ערכת ההרצה' (RSID) הזמינים המופיעים על המסך כדי לאשר את ה-RSID עבור הדגימות המעובדות כעת.

10. בחר את ה-RSID על-ידי נגיעה במסך ובחר באפשרות "Next" (הבא) בממשק של מסך המגע.

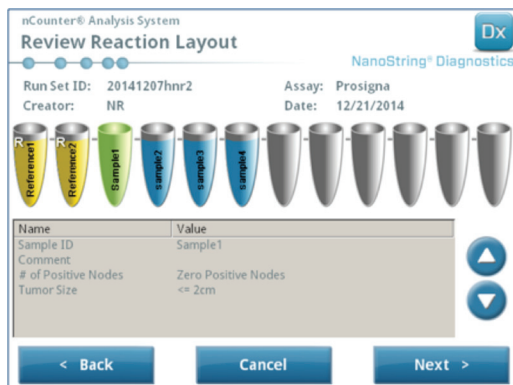
11. בממשק של מסך המגע ודא שבחרת ב-RSID המתאים על-ידי בדיקה של כל מבחנה על גבי המסך והתאמת פרטי הדגימה בין השניים.

א. ניתן להשתמש בגיליון העבודה של ערכת ההרצה לשם מעקב אחר הדגימה ולמטרות אימות.

ב. אם נבחר RSID שגוי, גע בלחצן "Back" (חזור) ובחר את מזהה ה-RSID הנכון.

ג. אם ה-RSID היה נכון אך קיימות שגיאות בהזנת הדגימה, גע בלחצן "Back" (חזור) ועבור לתחנת עבודה של המחשב, שם ערוך את ה-RSID באמצעות היישום המקוון.

איור 7: עיבוד מסך הרצה בתחנת הכנה



12. במסכים הבאים תתבקש לסרוק את מזהי הברקוד של הריאגנטים המבוקשים בשדות הפתוחים או לאשר את מיקומם של החומרים המתכלים הנדרשים על גבי משטח התחנה. לאחר ביצוע כל אחת מהמשטחים, בחר באפשרות "Next" (הבא) בממשק של מסך המגע כדי לעבור להנחיה הבאה.

הערה: משטח הכנה אחד ומבחנת חימום ריקה אחת בלבד נדרשים להרצות המבוצעות באמצעות ערכת Prosigna המכילה 1, 2, 3 או 4 בדיקות. להרצות של ערכה המכילה 1, 2, 3 או 4 בדיקות, הנח את משטח ההכנה ומבחנת חימום ריקה במקומות הקדמיים שלהם בהתאמה (הכי קרוב למשתמש) על גבי משטח תחנת ההכנה.

13. הוצא את הדגימות מבלוק החימום.

הערה: התחל להריץ את תחנת ההכנה תוך 15 דקות מרגע הוצאת הדגימות מבלוק החימום.

14. הנח את מבחנות הרצועה ב-Picofuge או במיני-צנטריפוגה וסרכז לזמן קצר (ב- $g \times 3000 <$).

15. הסר בעדינות את הפקקים מהמבחנות.

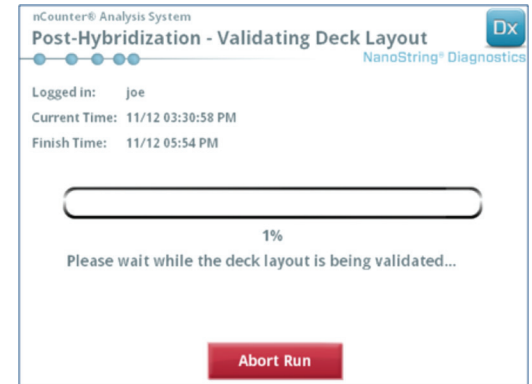
16. השתנות במבחנות והקווים המנחים בתחנת ההכנה צריכים להעיד על הסדר והכיוון הנכונים של הדגימות.

17. הנח את המבחנות עם השקעים לפי הסדר 1-12 משמאל לימין על גבי משטח תחנת ההכנה של nCounter. בעת ביצוע הרצה של ערכה המכילה 1, 2, 3, או 4 בדיקות, יש להניח רק את המחצית הראשונה של רצועת המבחנות (שקעים 1-6) בצד שמאל של מחזיק מבחנות הדגימה על-גבי משטח, במידת האפשר. שים לב שחשוב להשתמש בשקעים 1-6 בלבד; המחצית השנייה של רצועת המבחנות (שקעים 7-12) לא תתאים לחצי השני של המחזיק בשל העיצוב המחוץ של המבחנה.

18. ודא שהמבחנות מונחות היטב בתחנת ההכנה וסגור את מכסה המתכת.

19. אם המכסה אינו נסגר היטב, תתבקש לסגור אותו במהלך אימות פריסת המשטח.
20. בחר באפשרות "Next" (הבא) בממשק של מסך המגע.
21. סגור את דלת המכשיר כאשר תתבקש לכך ובחר באפשרות "Next" (הבא) כדי להתחיל באימות פריסת המשטח.
22. אם אירעה שגיאה, מלא אחר ההנחיות המשויות לשגיאה הספציפית כדי להמשיך באימות פריסת המשטח.

איור 8: תחנת הכנה לאימות פריסת המשטח לאחר ההכלאה



23. לאחר אימות פריסת המשטח, בחר באפשרות "Start Processing" (התחל עיבוד) בממשק של מסך המגע.
24. **הערה:** אתה נתקל בבעיות בהפעלת תחנת ההכנה, החזר את הדגימות שנקשרו לבלוק החימום; אבל אל תחרוג מהזמן המרבי של 21 שעות.
25. מלא אחר ההנחיות של תחנת ההכנה לאחר השלמת ההרצה.
26. לאחר סיום ההרצה של תחנת ההכנה, הוצא בזהירות את המחסנית מתחנת ההכנה ואטום את השקעים של המחסנית בעזרת הכיסוי הנדבק המצורף, המיועד למחסנית.
27. **הערה:** אל תשאיר את המחסנית לא אטומה בתחנת ההכנה למשך הלילה.
28. אם אינך מתכוון לסרוק את הדגימות באותו יום, אחסן את המחסנית בטמפרטורה של 4°C במארז אטום למשך שבוע אחד לכל היותר.

סריקת המחסנית בכלי הניתוח הדיגיטלי של nCounter

1. אתר את כלי הניתוח הדיגיטלי המקושר לתחנת ההכנה שעבדה את הדגימות. הנח את המחסנית על כלי הניתוח הדיגיטלי של nCounter לסריקה.
 - א. פתח את הדלת של כלי הניתוח הדיגיטלי.
 - ב. הנח את המחסנית שברצונך להוסיף בחריץ ריק.
 - ג. סגור את הדלת ועיין בתצוגה של מסך המגע.
2. הממשק של מסך המגע של כלי הניתוח הדיגיטלי כולל כמה איורים גרפיים שונים שסייעו לך לזהות בקלות את מצב המיקום:
 - א. מקום ריק: חריץ זה ריק ומוכן שיניחו בו מחסנית חדשה.
 - ב. מחסנית כחולה מלאה: הסריקה הסתיימה.
3. **אין להוציא את המחסניות הבאות:**
 - א. מחסנית לבנה: חריץ זה מכיל מחסנית שנרשמה אך לא נסרקה.
 - ב. מחסנית כחולה חלקית: חריץ זה מכיל מחסנית הנמצאת בתהליך סריקה.
4. ניתן להוציא מכלי הניתוח הדיגיטלי מחסניות שסריקתן הושלמה.
5. אם זו המחסנית הראשונה שהונחה בכלי הניתוח הדיגיטלי גע בלחצן "Diagnostics" (דיאגנוסטיקה) ולאחר מכן בחר באפשרות "Main Menu" (תפריט ראשי) כדי להיכנס לכלי הניתוח הדיגיטלי. אם כלי הניתוח הדיגיטלי כבר סורק מחסניות, המשיך לשלב 9 להלן.
6. הנח בזהירות את המחסנית בתוך חריץ פנוי (ראה הנחיות לגבי מצב המיקום לעיל) בכלי הניתוח הדיגיטלי. החריץ והמחסנית מסומנים כדי להבטיח כיוון נכון. על הברקוד לפנות כלפי מעלה.
7. הנמך את מכסה החריץ ולחץ על המחסנית דרך הפתח שבמכסה החריץ כדי להבטיח שהמחסנית מונחת היטב במקומה.
8. גע בלחצן "Start Counting" (התחל ספירה) והמתן שהסורק יתחיל בתהליך הסריקה. בזמן שכלי הניתוח הדיגיטלי מתחיל לסרוק את המחסנית תשמע סדרה של נקישות קצביות.
9. ודא שמופיע סרגל כחול במיקום של המחסנית על גבי המסך (כחמש דקות לאחר תחילת הסריקה), המציין שהסריקה החלה.

9. כדי להוסיף מחסנית לכלי ניתוח דיגיטלי שכבר סורק מחסניות, גע באפשרות "Pause" (השהה) במסך "Counting Cartridges" (ספירת מחסניות) והמתן להשהיית הסריקה הנוכחית על-ידי כלי הניתוח הדיגיטלי.
10. פתח את הדלת של כלי הניתוח הדיגיטלי.
11. הנח את המחסנית שברצונך להוסיף בחריץ ריק (ראה הנחיות לגבי מצב המיקום לעיל).
12. סגור את הדלת וגע באפשרות "Resume" (חדש פעולה).
13. לאחר סיום הסריקה התוכנה תשלח את הדוח לכתובת הדואר האלקטרוני של המשתמש שצוין קודם לכן.
14. עם קבלת האישור בדואר אלקטרוני, הוצא את המחסנית שסריקתן הושלמה והשלך אותן בהתאם להנחיות המוסד שאליו אתה שייך.
15. **הערה:** דוחות ייווצרו עבור הרצות שהסתיימו בהצלחה, וכן עבור הרצות בעלות שגיאות הקשורות לבקרת איכות (QC) הנתונים. לא ייווצרו דוחות במקרה של שגיאה שאינה קשורה לבקרת איכות נתונים. במקרה זה, פנה לשירות לקוחות של Veracyte לקבלת סיוע.
16. בעזרת הקישור המצורף להודעת דואר אלקטרוני זו, פתח את היישום המקוון והורד את כל שאר הדוחות הקשורים ל-RSID המעובד כעת.
17. פעל בהתאם להוראות המופיעות במקרה של שגיאה: פעל בהתאם להמלצה שצוינה בדוח הבדיקה במקרה של שגיאה בדגימה יחידה או שגיאת מערכת.
18. **הערה:** כשלים של דגימה יחידה אינם נחשבים לשגיאות מערכת.

12 פתרון בעיות וכשלים בבדיקות

טבלה 7: קודי שגיאה לחזרה על בדיקה

קוד שגיאה	תיאור הכשל	פעולה מומלצת
5	כשל בסריקה	הרץ מחדש את הדגימה עם 250 ng של RNA
7	אות גבוה	העבר שוב את הדגימה בספקטרופוטומטר והרץ שוב את הבדיקה עם 125 ng של RNA
6	אות חלש	העבר שוב את הדגימה בספקטרופוטומטר והרץ שוב את הבדיקה עם 500 ng של RNA
30	אות חלש	העבר שוב את הדגימה בספקטרופוטומטר והרץ שוב את הבדיקה עם 500 ng של RNA
31	אות RNA חלש	העבר שוב את הדגימה בספקטרופוטומטר והרץ שוב את הבדיקה עם 500 ng של RNA

סיבות לחזרה על הבדיקה:

1. דוח הבדיקה יזהה דגימות שנכשלו ולא ידווחו תוצאות בדיקה. תוצאות הבדיקה ידווחו במקרה של דגימות שהסתיימו בהצלחה.
2. דוח הבדיקה יזהה את סוג הכשל ואת הפעולה המומלצת במקרה של בדיקה שנכשלה. ניתן למדוד מחדש את ריכוז ה-RNA של דגימות שנכשלו ולהריץ מחדש את הדגימות (כחלק מאצווה חדשה/RSID חדש) בהתאם לסוג הכשל ולכמות מסת ה-RNA שנותרה כדי להשיג תוצאת בדיקה.

13 תוצאות הבדיקה

הבדיקה של Prosigna כוללת סדרה של מדדי בקרת איכות המוחלים באופן אוטומטי על כל אחת מהדגימות במהלך הניתוח. מדדים אלה מעריכים את ביצועי הבדיקה כדי לקבוע אם התוצאות הן בטווח העריכים המקובלים. לאחר ניתוח מוצלח של מדדי בקרת האיכות, הבדיקה של Prosigna מפיקה את התוצאות הבאות:

טבלה 8: תוצאות ופלט של הבדיקה של Prosigna

תוצאה	ערכי פלט
תת-הסוג הפנימי של דגימת סרטן השד	Luminal A Luminal B HER2-Enriched Basal-Like
הערכה פרטנית של ההסתברות להישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים	100%-0
דירוג הסיכון להישנות המחלה (ROR)	ערך שלם בסולם של 100-0
קטגוריית סיכון	נמוך, בינוני, גבוה

13.1 תת-סוגים פנימיים

הוכח כי תת-הסוג הפנימי של גידול סרטן השד קשור לפרוגנוזה בסרטן שד בשלב מוקדם. בממוצע, למטופלות בעלות גידול מסוג Luminal A יש תוצאות הרבה יותר טובות ממטופלות בעלות גידולים מסוג Luminal B, HER2-Enriched או Basal-like^{5,2}.

תת-הסוג הפנימי מזוהה על-ידי השוואת פרופיל ביטוי הגן של 50 גנים בדגימה לא ידועה לפרופיל הביטוי הצפויים עבור ארבעת התת-סוגים הפנימיים. תת-הסוג בעל הפרופיל הדומה ביותר מוקצה לדגימה הלא ידועה.

התת-סוגים הנפוצים ביותר של סרטן השד הם מסוג לומינלי - Luma Luminal A (LumA) B-ו Luminal (LumB). מחקרים קודמים מוכיחים כי Luminal A מהווה כ-30% עד 40% ממקרי סרטן השד, וכי Luminal B מהווה כ-20% ממקרי סרטן השד⁵. עם זאת, יותר מ-90% מהמטופלות עם גידולי קולטן הורמון חיובי הן בעלות גידולים לומינליים. דפוס ביטוי הגן של אותם תת-סוגים דומה לרכיבים האפיתליים הלומינליים של רקמת השד⁵. גידולים אלה מתאפיינים בביטוי גבוה של קולטן האסטרוגן (ER), קולטן הפרוגסטרוגן (PR) וגנים הקשורים להפעלה של ER, כגון GATA3, cyclin D1 ו-LIV1, וכן ביטוי של הצטוקרטנים הלומינליים 8 ו-18. גידולי סרטן שד מסוג Luminal A מגלים ביטוי נמוך יותר של גנים הקשורים להפעלה מחזור התא בהשוואה לגידולים מסוג Luminal B, מה שמוביל לפרוגנוזה טובה יותר.

מחקרים קודמים מוכיחים כי תת-הסוג HER2-Enriched (HER2-E) מהווה כ-20% ממקרי סרטן השד⁵. עם זאת, גידולים מסוג HER2-Enriched הם לרוב בעלי ER שלילי, כך שרק 5% מאוכלוסיית המטופלות בעלות ER חיובי שנבדקו התגלו כבעלות סרטן שד מסוג HER2-Enriched. ללא קשר למצב ה-ER, גידולים מסוג HER2-Enriched הם בעלי HER2 חיובי במרבית המקרים עם ביטוי גבוה של צבר ERBB2, כולל ERBB7-ו. גם גנים הקשורים להפעלה של מחזור התא הם בעלי ביטוי גבוה.

נתונים שפורסמו מעידים על כך כי תת-הסוג Basal-like מהווה כ-20% ממקרי סרטן השד⁵. עם זאת, גידולים מסוג Basal-like הם לרוב בעלי ER שלילי, כך שרק 1% מאוכלוסיית המטופלות בעלות גידולי קולטן הורמון חיובי הן בעלות סרטן שד מסוג Basal-like. תת-הסוג Basal-like הוא כמעט תמיד בעל ביטוי שלילי של HER2 מבחינה קלינית, ומבטא סדרה של סמנים ביולוגיים "בסיסיים" (basal), כולל ציטוקרטנים אפיתליים בסיסיים (CK) וקולטן של פקטורי גידול של האפידרמיס (EGFR). גנים הקשורים להפעלה של מחזור התא הם בעלי ביטוי גבוה.

13.2 דירוג הסיכון להישנות המחלה (ROR)

דירוג ה-ROR הוא ערך שלם בסולם של 0-100 הקשור להסתברות של מטופלת יחידה להישנות מרוחקת של המחלה בטווח של 10 שנים עבור האוכלוסייה שהוגדרה לשימוש המיועד. דירוג ה-ROR מחושב על-ידי השוואת פרופיל הביטוי של 46 גנים בדגימה לא ידועה לפרופילים הצפויים של ארבעת התת-סוגים הפנימיים, כמתואר לעיל, כדי לחשב ארבעה ערכי מתאם (קורלציה) שונים. לאחר מכן משלבים את ערכי המתאם עם שיעור התרבות וגודל הגידול הכולל לחישוב דירוג ה-ROR.

13.3 הסתברות של הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים

דירוגי ה-ROR עבור 2 הקוהורטים של נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם בעל גידולי קולטן הורמון חיובי הושוו לשיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת לאחר ניתוח וטיפול אנדוקריני משלים (אדג'ובטי) שנמשך 5 שנים, בליווי תקופת מעקב של 5 שנים (לקבלת פרטים עיין בסעיף 16.4 "ביצועים קליניים"). שני המחקרים הללו הובילו למודל המקשר את דירוג ה-ROR להסתברות של הישנות מרוחקת בקרב אוכלוסיית המטופלות שנבדקו, כולל רווח בר-סמך של 95%.

13.4 סיווג הסיכון

סיווג הסיכון מסופק גם כדי לאפשר פרשנות של דירוג ה-ROR על-ידי שימוש בערכי סף (Cutoffs) הקשורים לתוצאות קליניות באוכלוסיות של מטופלות שנבדקו.

טבלה 9: סיווג הסיכון על-ידי טווח ה-ROR ומצב הקשריות

מצב הקשריות	טווח ה-ROR	סיווג הסיכון
קשריות-שלילי	40-0	נמוך
	60-41	בינוני
	100-61	גבוה
קשריות-חיובי (1-3 קשריות)	15-0	נמוך
	40-16	בינוני
	100-41	גבוה
קשריות-חיובי (4 ≤ קשריות)	100-0	גבוה

13.5 בקרת איכות

כל מנה של רכיבי הבדיקה של Prosigna נבדקת באמצעות מפרטים שנקבעו מראש. כל הפריטים ברמת הערכה ניתנים למעקב כמנות, והרכיבים הקריטיים הכלולים בכל ערכה נבדקים יחד ומופצים כמנה של ערכת Prosigna.

ערכת הבדיקה של Prosigna כוללת סדרה של בקרות פנימיות המשמשות להערכת האיכות של כל ערכת הרצה בכלל ושל כל דגימה בפרט. בקרות אלה מופיעות להלן.

סדרת בקרות של אצווה: דגימת ייחוס RNA שעברה שעתוק *In vitro* (במעבדה)

דגימת ייחוס של RNA סינתטי כלולה כבקרה בערכת הבדיקה של Prosigna. דגימת הייחוס מכילה מטרות RNA שעברו שעתוק *in-vitro* (במעבדה) מהאלגוריתם לסיווג 50 גנים ו-8 הגנים של התחזוקה השוטפת.

דגימת הייחוס מעובדת בכפילות בכל אחת מהבדיקות המורצות של Prosigna, עם סדרה של עד 10 דגימות RNA לא ידועות של גידולי סרטן שד ברצועה של 12 מבחנות תגובה. האות מדגימת הייחוס מנותחת כנגד ערכי סף מוגדרים מראש כדי לאשר את ההרצה.

האות מכל אחד מ-50 הגנים של האלגוריתם בדגימת ה-RNA של גידולי סרטן השד מנורמלת לגנים המתאימים של דגימת הייחוס.

סדרת בקרות חיוביות: מטרות RNA שעברו שעתוק *in vitro* (במעבדה) והגלאי המדווח וגלאי הלכידה המתאימים

מטרות RNA סינתטיות משמשות כבקרות חיוביות (PCs) עבור הבדיקה של Prosigna. הרצפים של מטרות ה-PC נגזרים מספריית רצפי הדנ"א של External RNA Control Consortium (ERCC)⁶. מטרות ה-RNA עברו שעתוק *in-vitro* (במעבדה) מפלסמידים של דנ"א. שש מטרות RNA כלולות בערכת הבדיקה בסדרת טיטור בת 4 שלבים (ריכוז סופי של 0.125–128 fM בתגובת ההכלאה) במקביל לגלאי הלכידה וגלאי המדווח המתאימים. בקרות ה-PC נוספות לכל דגימת RNA של סרטן השד ודגימת ייחוס הנבדקות בעזרת הבדיקה של Prosigna. דגימה לא תאושר לאנליזה נוספת אם עוצמות האות מבקרות ה-PC אינן ערכי סף שהוגדרו מראש.

סדרת בקרות שליליות: גלאים אקסוגניים ללא מטרות

רצפים של מטרות בעלות בקרה שלילית נגזרים מספריית רצפי הדנ"א של ERCC⁶. הגלאים שנועדו לאתר את רצפי המטרות הללו כלולים כחלק מערכת הבדיקה ללא רצף המטרות המתאים. הבקרות השליליות (NCs) נוספות לכל דגימת RNA של סרטן השד ודגימת ייחוס הנבדקות בעזרת הבדיקה של Prosigna כמדד של בקרת איכות. הדגימה לא תאושר לאנליזה נוספת אם עוצמות האות מבקרות ה-NC אינן עומדות בערכי סף שהוגדרו מראש.

סדרת בקרות של שלמות ה-RNA: גנים של תחזוקה שוטפת

גלאי הלכידה והגלאי המדווח, שנועדו לאתר 8 גנים של תחזוקה שוטפת ו-50 גנים של אלגוריתם, כלולים כחלק מערכת Prosigna. רמות הביטוי של 8 הגנים של התחזוקה השוטפת מנותחות כדי לקבוע את איכות ה-RNA אשר מוצה מדגימת הרקמה שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE) והוזן לבדיקה של Prosigna. הדגימה לא תאושר לאנליזה נוספת אם רמות הביטוי של הגנים של התחזוקה השוטפת קטנות מערכי סף שהוגדרו מראש.

הגנים של התחזוקה השוטפת משמשים גם לנרמול ההבדלים בכמות ה-RNA השלמה בדגימה לפני נרמול דגימת הייחוס.

14 מגבלות ההליכים

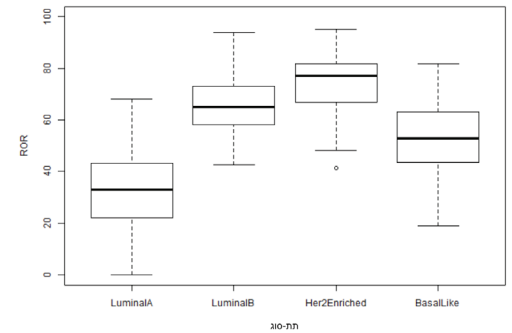
1. בדיקת Prosigna מוטבה לזיהוי תת-הסוג הפנימי של גידול סרטן השד והסיכון של המטופלת להישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים כדירוג ROR וקטגוריית סיכון, באמצעות RNA טהור אשר מוצה מרקמת שד אנושית שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE). סוגים אחרים של דגימות או חומרי קיבוע לא נבדקו ואין להשתמש בהם.
2. הביצועים של בדיקת Prosigna תוקפו באמצעות ההליכים המופיעים בעלון זה בלבד, המצורף לאריזה. שינויים בהליכים אלה עשויים לשנות את ביצועי הבדיקה.
3. מאפייני הביצועים של בדיקת Prosigna הוכחו בעבור נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם בעל גידולי קולטן הורמון חיובי, לאחר טיפול אנדוקריני משלים (אדג'ובטי) שנמשך 5 שנים. ביצועים עם משטרי טיפול שונים או בקרב אוכלוסיות של מטופלות אחרות לא הוכחו.
4. אם לבדיקה נוסף RNA בכמות או באיכות בלתי מספקת, ייתכן שבדיקת Prosigna לא תצליח להניב תוצאה תקפה ובמקום זאת תדווח על כשל של הבדיקה.
5. יש להעריך את הפרשנות של תוצאות הבדיקה של Prosigna (תת-סוג פנימי, דירוג ROR, קטגוריית סיכון) בשילוב עם גורמים קליניים-פתולוגיים אחרים, ההיסטוריה הרפואית של המטופלות וכל תוצאות הבדיקות האחרות של המעבדה.
6. הביצועים של בדיקת Prosigna הוכחו בעבור RNA העומד במפרטים שהוגדרו ביחס להליך האמור לעיל. ביצועים עם RNA מבודד שאינו עומד במפרטים אלה, לא הוכחו.
7. חומרים ידועים שמפריעים לבדיקת Prosigna כוללים דנ"א גנומי ורקמה שאינה רקמת גידול (לדוגמה, רקמה תקינה). עיין בשיקולי הבדיקה הכלליים לפני תחילת התהליך. לפני תחילת התהליך, על פתולוג לזהות בביור את האזור של סרטן השד הפולשני החי מסוג קרצינומה. כמו כן, יש לטפל בכל דגימת RNA עם DNase. לפני שתמשיך עם דגימות הבדיקה של המטופלות, עליך לבדוק ולאשר כל מנה חדשה של DNase על-פי המפרט המסופק בעת השימוש בערכת ביזוד שאינה ערכת הביזוד Roche FFPE RNA.

הבדיקה של Prosigna מעבירה דיווח הכולל דירוג ROR (0-100), תת-סוג פנימי (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched או Basal-like) וקטגוריית סיכון (נמוך, בינוני או גבוה) עבור כל דגימת גידול. בהתבסס על שני מחקרי התיקוף הקליני המתוארים להלן, בקרב נשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם בעל גידולי קולטן הורמון חיובי (HR+) אשר טופלו באנאסטרוזול (Anastrozole) או טמוקסיפן (Tamoxifen) בניסויים ABCSG-8 ו-ATAC, מופיעים הטווח והשכיחות של דירוגי ROR (איור 10), הקשר הרצוף של ROR להסתברות להישנות מרוחקת לפי מצב הקשריות (איור 11) והתפלגות דירוגי ROR לפי תת-סוג פנימי (איור 9) הצפויים. על סמך מחקרי תיקוף קליני אלה, מוצג שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים לפי סיווג הסיכון באיור 12 (מטופלות עם מצב קשריות שלילי) ואיור 13 (מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)).

15.1 טווח ה-ROR לפי תת-סוג

איור 9 מציג תרשים קופסה של דירוג ROR לפי תת-סוג פנימי.

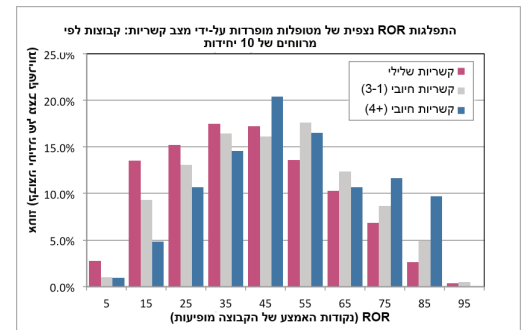
איור 9: תרשים קופסה של דירוג ROR לפי תת-סוג פנימי



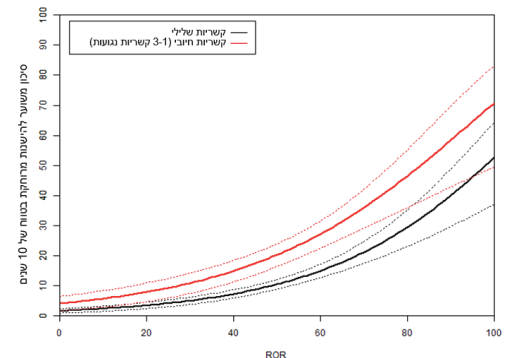
15.2 שכיחות של דירוג ROR לפי מצב קשריות

ההיסטוגרמה באיור 10 נוצרה באמצעות מודל קוקס יחיד אשר כלל דירוג ROR ומשתנים קטגוריים כדי להבחין בין שלוש קבוצות הגידול המערב קשריות.

איור 10: ההיסטוגרמה של דירוג ROR וקבוצות מצב קשריות



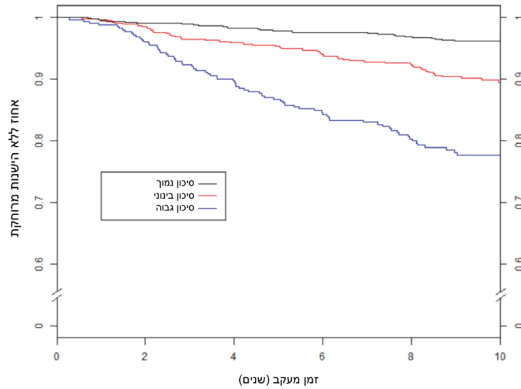
איור 11: סיכון צפוי משוער בטווח של עשר שנים בתוך קבוצת מצב הקשריות



15.3 שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת לפי סיווג סיכון

הנתונים הבאים לקוחים מהניתוח המשולב של הניסויים TransATAC ו-ABCSG-8. על מנת להקצות את המטופלות לקבוצות סיכון, הושו דירוגי ה-ROR לערכי סף סיכון מוגדרים מראש עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי או חיובי. איורים 12 ו-13 מציגים את שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים עבור כל קבוצת קטגוריית סיכון לפי מצב קשריות.

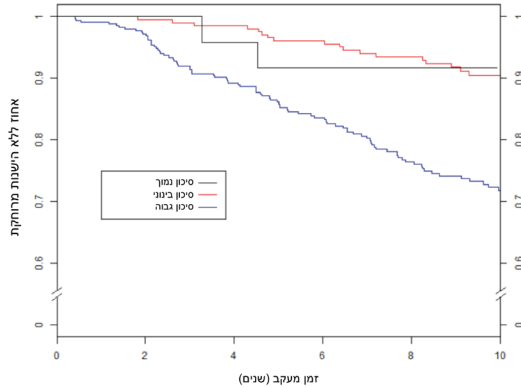
איור 12: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 12 DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	875 (49%)	31	96.2% [94.7% - 97.3%]
בינוני	551 (31%)	53	89.2% [86.1% - 91.7%]
גבוה	360 (20%)	73	77.7% [72.8% - 81.9%]
סה"כ	1,786 (100%)	157	

איור 13: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכום נתונים עבור איור 13 DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)

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

טבלה 10: שיעורי DRFS בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות עם 4 קשריות נגועות ומעלה

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

16.1 דיוק אנליטי והדירות

כדי לאמוד את מידת הדיוק וההדירות הכוללת של Prosigna, נערכו שני מחקרים ותוצאותיהם שולבו. המחקר הראשון שנערך היה מחקר לבדיקת דיוק (Precision) של מערכת nCounter Analysis System שהחל עם RNA שמוזה מגידול סרטני, והמחקר השני היה מחקר שבדק הדירות (Reproducibility) שהחל עם רקמת גידול סרטן השד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE), אשר כלל גורמים טרום-אנליטיים.

דיוק RNA

16.1.1 תכנון המחקר

מחקר השוואתי אקראי וסמוי נערך בשלושה אתרים עם הבדיקה של Prosigna על מערכת nCounter Analysis System להערכת הדיוק האנליטי. במחקר נוצרו חמש דגימות RNA משולבות של גידול סרטני שנלקחו מדגימות FFPE שמורות בארכיון - לבדיקה בכל אחד מהאתרים. פאנל הדגימות ייצג פרופילי ביטוי גנים טיפוסיים שהופיעו במהלך בדיקה שגרתית וכל אחת מקבוצות סיווג הסיכון.

כל אתר השלים 18 הרצות תקפות (9 הרצות על-ידי כל מפעיל, כאשר כל הרצה כללה 10 בדיקות) לאחר הרצת היכרות שביצע כל מפעיל (טבלה 11). כל דגימה נבדקה פעמיים במהלך כל הרצה ברמת קלט RNA נומינלית של 250 ng עבור הבדיקה. כל מפעיל השלים הרצה אחת ביום נתון על-פי התקן המקובל לשיטות של הרצות ארוכות⁷. תקופת המחקר הכוללת, כולל הרצת היכרות, הסתכמה ביותר מ-4 שבועות בכל אתר.

טבלה 11: סקירה כללית של מחקר דיוק ה-RNA

מספרים	משתנה המחקר
5	# דגימות RNA של גידול סרטן השד
2	# רפליקציות (שכפול) דגימה לכל הרצה (אותה מחסנית)
18	# הרצות/לאחר
1	# הרצות/ליום
2	# מפעילים/לאחר
3	# מנות ריאנטים/לאחר
3	# אתרים
180	סה"כ # דגימות שנבחנו בכל אתר (ללא הרצת היכרות)
540	סה"כ # הדגימות =

16.1.2 ניתוח רכיבי השונות

טבלה 12 מציגה את הפלט מניתוח מרכיבי השונות עבור כל פריט פאנל. מתחת לשונות המשווערת מופיע אחוז השונות הכוללת (בסוגריים).

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

פריט פאנל לפי סיכון, תת-סוג	ROR ממוצע	מרכיב שונות					שונות כוללת (SD)	סה"כ סטיית תקן
		מנה	אתר	מפעיל	הרצה	בתוך הרצה		
נמוך Luminal A	31.4	0.010 (2%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.134 (30%)	0.296 (67%)	0.44 (100%)	0.66
בינוני Luminal B	55	0.105 (18%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.046 (8%)	0.426 (74%)	0.576 (100%)	0.76
בינוני Basal-like	55.4	0.059 (20%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.046 (15%)	0.194 (65%)	0.299 (100%)	0.55
גבוה Luminal B	64.8	0.119 (21%)	0.014 (2%)	0.000 (0%)	0.064 (11%)	0.380 (66%)	0.576 (100%)	0.76
גבוה HER2-enriched	76.2	0.165 (37%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.277 (63%)	0.442 (100%)	0.66

עבור כל חמשת פריטי הפאנל, סטיית התקן הכוללת היתה קטנה מ-1 יחידת ROR בסולם של 0–100. עבור כל פריט הפאנל, מרבית השונות מקורה בשונות בתוך ההרצה (הדירות). כמעט ולא הופיעה שונות בין אתר-לאחר או שונות בין מפעיל-למפעיל. בדיקת יחס ניראות (Likelihood ratio test) למובהקות של אתר לפי פריט פאנל גילתה שההבדלים באתר היו בלתי מובהקים מבחינה סטטיסטית ($p > 0.05$). עבור כל מנה, דירוגי ה-ROR הממוצעים קטנים מ-1 יחידת ROR בנפרד לכל פריט פאנל, מה שתרם כ-20% בממוצע לשונות הכוללת.

16.1.3 שיעור קונקורדנציה של קריאת תת-סוג וסיווג סיכון

עבור כל פריטי הפאנל התגלה שיעור קונקורדנציה של 100% בין תוצאת תת-הסוג לתת-הסוג הפנימי של פריט הפאנל. בכל הדגימות התגלה שיעור קונקורדנציה של 100% בין קבוצת הסיכון הנמדדת והצפויה.

הדירות הרקמה

16.1.4 תכנון המחקר

מחקר השוואתי אקראי וסמוי שנערך בשלושה אתרים השתמש בדגימות רקמה משוכפלות של סרטן שד, הלקוחות מאותו גוש FFPE, שנבדקו במערכת nCounter Analysis System באמצעות הבדיקה של Prosigna. כחלק מהמחקר נבדקה סדרה של 43 דגימות רקמה של סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) שנלקחו לאחרונה ממטופלות עם סרטן שד בעל גידולי קולטן הורמון חיובי, שאובחנו בבירור כבעלות קרצינומה דוקטלית ו/או לובולרית פולשנית. כל דגימות הרקמה נשלחו לאתר המחקר המתאים לעיבוד. 43 הדגימות נבדקו באופן בלתי-תלוי על-ידי שלושה פתולוגים נפרדים. בכל דגימה שנבדקה על-ידי פתולוג בוצעו ההליכים הבאים: הרצת מבחן שכללה מאקרו-דיסקציה של הרקמה, מיצוי RNA וביצוע הבדיקה של Prosigna על-ידי מפעיל אחד בכל אתר, בעזרת הליך הבדיקה המוגדר. ה-RNA המבודד מכל אחת מדגימות הרקמה נבדק פעמיים בהרצות בדיקה נפרדות. לצורך ביצוע המחקר נעשה שימוש בשלוש מנות של ערכת בידוד RNA (אחת לכל אתר) ובמנה יחידה של ריאנטים של ערכת הבדיקה. זכוכית נושא אחת הזנה למיצוי ה-RNA כאשר אזור שטח הפנים של הגידול היה ≤ 100 ממ"ק, ו-3 זכוכיות נושא הזנה כאשר אזור שטח הפנים של הגידול היה > 100 ממ"ק, כאשר דרישת המינימום לאזור שטח הפנים של הגידול היתה 4 ממ"ק.

16.1.5 סיכום הבדיקה

שיעור הקריאה (Call rate) של 43 דגימות הרקמה שנבדקו בכל אחד משלושת האתרים מופיע בטבלה 13.

טבלה 13: שיעור הקריאה בכל אתר

אתר	אחוזים שהניבו תוצאה	עובר/סה"כ
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

40 דגימות הניבו תוצאות בכל האתרים (נדרשה חזרה על בידוד RNA של דגימה אחת באתר אחד), 1 דגימה הניבה תוצאות ב-2 אתרים, ו-2 דגימות הניבו תוצאות באתר אחד. מאה אחוז (100%) מהדגימות שעברו את מפרטי בדיקת הרקמה ובידוד ה-RNA הניבו תוצאות עוברות בבדיקה של Prosigna. אזור שטח הפנים הנמדד של הגידול ל-4/5 כשלים של בידוד RNA היה ≥ 15 ממ"ק, השווה לערך קטן מ-50 ממ"ק של סה"כ רקמה לפי קלט אזור בבדיקה.

43 הדגימות כללו מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי וחיובי כאחד. תוצאות הבדיקה שחושבו מ-43 הדגימות מייצגות טווח רחב (94 יחידות) של דירוגי ROR, את כל 4 התת-סוגים הפנימיים ואת כל קטגוריות הסיכון כאשר מחילים את ערכי הסף (Cutoffs) של מצב קשריות שלילי או מצב קשריות חיובי על כל הדגימות. שתי הדגימות עם התוצאות באתר אחד לא נכללו בכל הניתוחים הסטטיסטיים שבוצעו לאחר מכן מאחר שלא היו נתונים זמינים להשוואה בין אתרים.

16.1.6 ניתוח רכיבי השונות

לא נמצאו הבדלים מובהקים סטטיסטית ($\alpha = 0.05$) בין קטגוריות סיכון במבחן קרוסקל-וואליס (Kruskal-Wallis) א-פרמטרי, לכן מודל מרכיבי השונות הותאם בכל קטגוריות הסיכון בו-זמנית.

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

טבלה 14: מרכיבי השונות (מחקר הדירות הרקמה)

סה"כ סטיית תקן (SD)	מרכיבי השונות			
	אתר	בתוך בלוק	שיורי	סה"כ
0.10	7.72	0.51	8.34	2.89

המרכיב "אתר" מודד שונות שיטתית ספציפית לאתר, המרכיב "בתוך בלוק" מודד את השונות האקראית המשתנה כפונקציה של סקירה/עיבוד דגימת הרקמה או השונות בתוך בלוק ה-FFPE, והשונות השיורית מודדת את ההשתנות המשולבת של הרצה-להרצה וההשתנות בתוך-הרצה בבדיקה של Prosigna. המרכיב "אתר" קטן מאוד ביחס להשתנות האקראית בתוך הבלוק, עובדה המעידה על כך שההבדלים בממוצע בין האתרים היו זניחים ($> 1\%$ מהשונות הכוללת). השונות השיורית תאמה להשתנות שוות-הערך שנמדדה במחקר דיוק ה-RNA אשר כלל פחות דגימות, אך יותר מדדי שכפול (0.51 שונות בהשוואה לאתר יחיד ממוצע בשונות מנת ריאנטים ב-Prosigna של 0.39 עבור מחקר דיוק ה-RNA).

טבלה 15 מסכמת את ההשתנות הכוללת בעזרת הסכום של השתנות עיבוד הרקמה (המרכיבים "אתר" ו"בתוך הבולק" מטבלה 14 של מחקר זה), וכן השתנות עיבוד ה-RNA הכוללת ממחקר דיוק ה-RNA (הממוצע בין חמשת פריטי השאלה שנבדקו בטבלה 12). גורמים טרום-אנליטיים הקשורים לעיבוד הרקמה הם מקור השונות העיקרי עבור הבדיקה (94% מהשונות הכוללת). סה"כ סטיית התקן (SD), כולל כל מקורות השונות, שווה ל-2.9, עובדה המעידה על כך שהבדיקה של Prosigna היא מדד מהימן של ההבדל בין שני ערכי ROR של 6.75 ברמת ביטחון של 95%.

טבלה 15: השתנות כוללת (עיבוד הרקמה ועיבוד ה-RNA)

השתנות עיבוד הרקמה	השתנות עיבוד ה-RNA	השתנות כוללת	סה"כ סטיית תקן (SD)
7.82	0.47	8.29	2.9

16.1.7 שיעור קונקורדנציה של קטגוריית סיכון וסיווג תת-סוג

שיעור הקונקורדנציה באתר-לאחר לפי תת-הסוג וסיווג הסיכון של המטופלות (סיכון נמוך/בינוני/גבוה) מופיע בטבלה 16, שם הוחלו ערכי הסף (Cutoffs) של הסינוגים מצב קשריות שלילי או מצב קשריות חיובי על כל הדגימות. רמות הסמך של 95% מאותו סוג מופיעות בסוגריים מרובעים ומספר הדגימות עם תוצאות בשני האתרים מופיע בסוגריים. שיעור הקונקורדנציה הממוצע מופיע בעמודה האחרונה. עבור כל השוואה חושב שיעור הקונקורדנציה בשני שלבים. ראשית, היחס בין ארבעת זוגות-התוצאות האפשריים (שניים באתר 1 * שניים באתר 2) שהתאימו, חושב עבור כל דגימת רקמה. בשלב השני, חושב ממוצע של היחסים הללו בכל דגימות הרקמה אשר יצרו תוצאות בשני האתרים בהשוואה הנתונה.

טבלה 16: סיכום של שיעור הקונקורדנציה של התת-סוגים וקטגוריית הסיכון לפי מצב הקשריות

שיעור קונקורדנציה של כל זוג	סוג השוואה		
	אתר 1 לעומת אתר 2 (n = 40)	אתר 1 לעומת אתר 3 (n = 41)	אתר 2 לעומת אתר 3 (n = 40)
תת-סוג	96.3% [99.5%-86.4%]	98.8% [100% - 91.0%]	95% [99.3% - 83.1%]
קטגוריית סיכון	87.5% [95.8% - 73.2%]	92.7% [98.4% - 80.1%]	90% [97.2% - 76.4%]
קשריות-שלילי	88.8% [96.0% - 75.9%]	92.7% [98.4% - 80.1%]	91.3% [97.4% - 79.2%]
קטגוריית סיכון קשריות-חיובי			

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

1. דגימה אחת הניבה תוצאות כפולות של Luminal A באתר אחד ותוצאות כפולות של Luminal B בכל אחד משני האתרים האחרים.
2. דגימה אחת הניבה תוצאות כפולות של Luminal A באתר אחד, תוצאות כפולות של HER2-enriched באתר אחר ובאתר השלישי תוצאה אחת מכל אחד מתת-הסוגים הבאים - Luminal A ו-HER2-enriched.

16.2 רגישות / פלט RNA

תיאור מחקר קלט ה-RNA

המחקר בדק 13 דגימות RNA מגידול סרטן שד ב-3 רמות קלט RNA שונות במפרט הבדיקה (500, 250 ו-125 ng) ושתי רמות קלט RNA נוספות מחוץ למפרט (625, 625 ng). כל דגימה נבדקה עם כל אחת ממנות הערכה (סה"כ 2 מנות) בהרצת מבחן אחת, אשר כללה מדידות כפולות בכל רמה של מפרט ומדידה אחת עבור כל רמה מחוץ למפרט. מדידות ריקות (כלומר, ללא מטרה) ריקות נכללו בכל הרצת מבחן. דגימה יחידה נבדקה עם מנה יחידה בלבד.

תוצאות מחקר קלט ה-RNA

כל הדגימות הריקות שנמדדו (n = 46) גילו ערכים הרבה יותר נמוכים מערך הסף של האות והניבו תוצאה כושלת של הבדיקה (שיעור קריאה 0%). כל מדידות ה-RNA של הגידול במפרט הבדיקה (n = 138) הניבו תוצאה עוברת של הבדיקה (שיעור קריאה 100%). מאה אחוז (100%) מהדגימות עם רמת קלט מעל לרמה המצוינת במפרט (625 ng) הניבו תוצאה עוברת של הבדיקה. שמונים ושלושה אחוז (83%) מהדגימות (10/12) שנבדקו עם רמת קלט מתחת לרמה המצוינת במפרט (62.5 ng) הניבו תוצאה בדיקה במנה 1 עם 100% במנה 2.

דירוג ה-ROR הממוצע עבור 13 הדגימות כיסה טווח רחב (20-82). שיעור הקונקורדנציה של סיווג קבוצת הסיכון (נמוך/בינוני/גבוה) תאם ב-100% בכל רמות הקלט של ה-RNA

עבור 13 הדגימות שנבדקו. טבלה 17 מסכמת את השונות בדירוג ה-ROR כפונקציה של קלט RNA. ההבדל הממוצע בדירוג ה-ROR בין רמות הקלט של ה-RNA, סטיית התקן של ההבדלים והרווח בר-סמך של 90% שימשו את החוקרים כדי לבדוק אם דירוג ה-ROR שנוצרו מרמות קלט שונות של RNA השתנו לאלה שנוצרו באמצעות רמת מטרה של 250 ng כדי לעמוד בקריטריון הקבלה, הרווח בר-סמך חייב להיות בטווח של (ROR -3,3). בשתי הרמות הקיצוניות של טווח מפרט הבדיקה (רמות RNA של 125 ו-500 ng), דירוג ה-ROR השתנו לדירוגים שהתגלו בריכוז קלט מטרה של 250 ng עבור כל אחת משתי מנות הערכות שנבדקו. עבור כל רמה מחוץ למפרט הבדיקה, דירוג ה-ROR השתנו לדירוגים של אחת המנות, אך לא לשנייה.

טבלה 17: סיכום ההבדלים בין דירוגי ה-ROR. הספירה זהה למספר הדגימות הכלולות בביתוח.

מנת ערכות	מסה (ng)	ספירה	הבדל ROR ממוצע	סטיית תקן של ההבדל	גבול תחתון של רמת ביטחון	גבול עליון של רמת ביטחון
20535	250 - 62.5	10	1.90	2.62	0.54	3.26
	250 - 125	12	0.75	1.23	0.16	1.34
	250 - 500	12	0.04	0.78	-0.33	0.41
	250 - 625	12	-0.13	0.86	-0.53	0.28
20536	250 - 62.5	11	-0.36	3.96	-2.33	1.60
	250 - 125	11	-0.50	3.07	-2.02	1.02
	250 - 500	11	-0.82	3.25	-2.43	0.79
	250 - 625	11	-1.09	4.24	-3.19	1.01

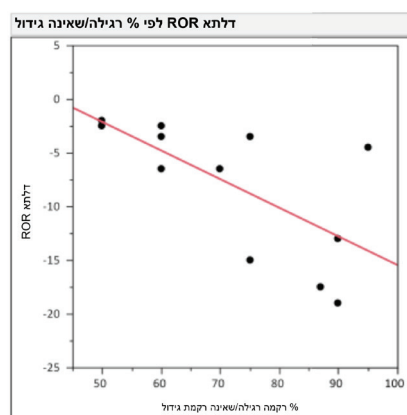
16.3 בדיקת הפרעות

רקמה סמוכה רגילה/שאינה רקמת גידול

לרוב, הבולקים של גידול סרטן השד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) כוללים רקמה סמוכה רגילה/שאינה רקמת גידול, וניתן לזהותה בבדיקה פתולוגית כאזור נפרד מהאזור של סרטן השד הפולשני. הליך הבדיקה של Prosigna האמור לעיל מנחה להסיר את הרקמה הסמוכה הרגילה באמצעות מאקרו-דיסקציה. כדי לאמוד את הסיכון לזיהום תוצאות הבדיקה על-ידי הרקמה הרגילה, נבדקו 13 בולקים של סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) בעלי קרצינומה דוקטלית פולשנית שאושרה על-ידי פתולוג, וכ-50-95% רקמה סמוכה רגילה/שאינה רקמת גידול - עם וולא מאקרו-דיסקציה של הרקמה הסמוכה, ונקבע ההבדל בדירוג ה-ROR (דלתא ROR).

בממוצע, שיעור ה-ROR של דגימת הגידול שעברה מאקרו-דיסקציה הסתכם בכ-8 יחידות ROR יותר מהשיעור הנצפה כאשר הרקמה הרגילה/שאינה רקמת גידול לא הוסרה. איור 14 מראה שככל שכמות הרקמה הרגילה גדלה (עד 95% מהרקמה לא הוסרה) במאקרו-דיסקציה) קיים סיכון גדול יותר שדירוג ה-ROR שדווח יציג הערכת חסר הסיכון להישנות המחלה בקרב המטופלות.

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



הפרעה של רקמה נמקית, מדממת ורקמת DCIS (קרצינומה דוקטלית לא חודרנית)

כדי לאמוד את הסיכון לזיהום תוצאות הבדיקה על-ידי רקמה נמקית/מדממת/רקמת DCIS, נבדקו 11 בולקים של סרטן שד שקובעים בפרפין (FFPE) (3 של רקמת DCIS, 5 של רקמה נמקית, 3 של רקמה מדממת) בעלי סרטן שד פולשני שאושר על-ידי פתולוג, וכ-10-30% מהרקמה המפריעה נבדקו - עם וולא מאקרו-דיסקציה של הרקמה המפריעה, ונקבע ההבדל בדירוג ה-ROR (דלתא ROR). ברמות שנבדקו, האפקט של הדם/הרקמה המדממת, רקמת DCIS הרקמה הנמקית שנכללו בתהליך היה זניח מבחינת דירוג ה-ROR שדווח (> 6 יחידות ROR). נמצא שיעור קונקורדנציה של 100% בהקצאת קטגוריית הסיכון בין 11 הדגימות שכללו רקמה נמקית, מדממת ורקמת DCIS עם וולא מאקרו-דיסקציה.

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

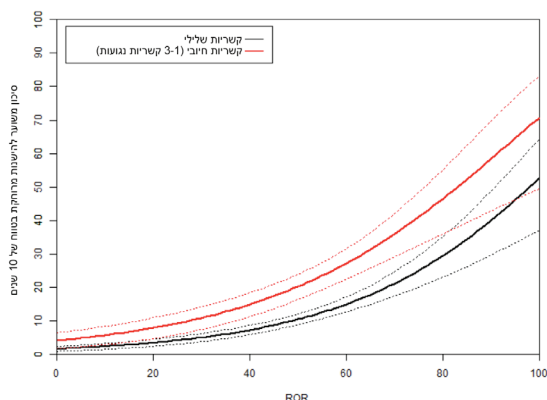
מאפיין	ערך	קשריות-שילי (n = 1,786)		3-1 קשריות נגועות (n = 590)		4 קשריות נגועות (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
טיפול	מעט אנסטרוזול (Anastrozole)	377 (51.0%)	528 (50.4%)	102 (49.0%)	184 (48.2%)	31 (57.4%)	25 (51.0%)
	טמוקסיפן (Tamoxifen) בלבד	362 (49.0%)	519 (49.6%)	106 (51.0%)	198 (51.8%)	23 (42.6%)	24 (49.0%)
שלב	G1	169 (22.9%)	210 (20.1%)	39 (18.8%)	54 (14.1%)	3 (5.6%)	7 (14.3%)
	G2/GX	438 (59.3%)	837 (79.9%)	122 (58.7%)	328 (85.9%)	37 (68.5%)	42 (85.7%)
	G3	132 (17.9%)	0 (0%)	47 (22.6%)	0 (0%)	14 (25.9%)	0 (0%)
גודל הגידול	≥ 2 ס"מ	122 (16.5%)	219 (20.9%)	13 (6.2%)	37 (9.7%)	3 (5.6%)	2 (4.1%)
	2-1 ס"מ	420 (56.8%)	568 (54.3%)	83 (39.9%)	193 (50.5%)	15 (27.8%)	18 (36.7%)
	3-2 ס"מ	157 (21.2%)	213 (20.3%)	77 (37.0%)	122 (31.9%)	18 (33.3%)	23 (46.9%)
	< 2 ס"מ	40 (5.4%)	47 (4.5%)	35 (16.8%)	30 (7.9%)	18 (33.3%)	6 (12.2%)
	שילי	649 (87.8%)	984 (94.0%)	186 (89.4%)	367 (96.1%)	47 (87.0%)	46 (93.9%)
מצב HER2	חיובי	90 (12.2%)	63 (6.0%)	22 (10.6%)	15 (3.9%)	7 (13.0%)	3 (6.1%)
	מרוחקת	79 (10.7%)	91 (8.7%)	50 (24.0%)	64 (16.8%)	31 (57.4%)	10 (20.4%)
סוגי הישנות	כל הישנות	117 (15.8%)	121 (11.6%)	59 (28.4%)	73 (19.1%)	34 (63.0%)	10 (20.4%)
	Luminal A	529 (71.6%)	725 (69.2%)	127 (61.1%)	248 (64.9%)	31 (57.4%)	31 (63.3%)
תת-סוג פנימי	Luminal B	176 (23.8%)	284 (27.1%)	68 (32.7%)	118 (30.9%)	20 (37%)	16 (32.7%)
	Basal-Like	7 (0.9%)	6 (0.6%)	2 (1.0%)	2 (0.5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2-Enriched	27 (3.7%)	32 (3.1%)	11 (5.3%)	14 (3.7%)	3 (5.6%)	2 (4.1%)

שני המחקרים כללו זרוע טיפול שכללה 5 שנות טיפול בטמוקסיפן (Tamoxifen). במחקר TransATAC, זרוע המחקר האחרת כללה 5 שנות טיפול באנסטרוזול (Anastrozole), בעוד במחקר ABCSG-8 הזרוע השנייה כללה שנתים של טיפול בטמוקסיפן ולאחריה 3 שנות טיפול באנסטרוזול. כאשר נערך מודל של הישנות מרוחקת (DR) כפונקציה של כל המשתנים הקליניים והטיפוליים, הטיפול לא תרם באופן מובהק ($p = 0.66$) כגורם המנבא DR. ההבדלים העיקריים האחרים בין ניסויים אלה היו העובדה שהניסוי TransATAC כלל מטופלות עם סרטן בשלב 3, וששיעור ההישנות הכולל היה גבוה יותר במחקר TransATAC מאשר במחקר ABCSG-8.

תוצאות

איור 15 מציג את הסיכון להישנות מרוחקת (DR) בטווח של 10 שנים כפונקציה של דירוג ROR עם רמות ביטחון של 95% בהתבסס על דגמי הסיכונים הפרופורציונליים של קוקס עבור כל קבוצת מטופלות במצב קשריות שילי ובמצב קשריות חיובי (3-1 קשריות נגועות).

איור 15: הסיכון המשוער להישנות מרוחקת (DR) בטווח של עשר שנים לפי מצב קשריות עם רמות סמך של 95%



איור 16 מציג את אומדי Kaplan-Meier (KM) ואומדי ההיארעות לפי קבוצות סיכון עבור מטופלות עם מצב קשריות שילי ואיור 17 מציג את אותם נתונים עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות נגועות. בכל איור, הפרטים של גודל הדגימה, מספרי האירועים והאחוז המשוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים מסופקים.

הליך הבדיקה של Prosigna כולל הסרה של דנ"א גנומי אנושי (gDNA) על-ידי עיכול באמצעות DNase. כדי לאמוד את הסיכון לזיהום תוצאות המחקר על-ידי gDNA, נבדקו עשרה (10) בלוקים של גידול סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) המכילים קרצינומה דוקטלית פולשנית שאושרה על-ידי פתולוג, עם וללא (-/+) הסרה של דנ"א גנומי אנושי, על-ידי השמטת שלב ה-DNase בתוך ההליך. בדגימות שנבדקו, בממוצע, דירוג ה-ROR היה נמוך ב-4 עד 5 יחידות בקבוצות הסיכון "נמוך" ו"בינוני" כאשר ה-gDNA הוסר באמצעות DNase I (ראה טבלה 18). כאשר הדגימות שלא טופלו באמצעות DNase, טופלו לאחר מכן ב-DNase (לאחר הטיפול), דירוג ה-ROR תאמו לערכי ה-ROR שנצפו במקור בטיפול ה-DNase שנכלל בפרוטוקול. קיים סיכון שדירוג ה-ROR שדווח יציג הערכת יתר של הדירוג בנקודות או הטיה חיובית של הדירוג בנקודות (עד 7 יחידות ROR) לגבי הסיכון להישנות המחלה בקרב המטופלות בנוכחות gDNA. כמו כן, האות שחושב עבור דגימות שלא טופלו ב-DNase היה נמוך באופן מובהק ($p < 0.05$) מהדגימות שטופלו ב-DNase עקב הפרעה בקריאת יכולת הספיגה המשמשת לכימות ה-RNA לפני ביצוע הבדיקה של Prosigna.

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

ROR קטגוריה	דגימות FFPE שנבדקו	הבדל בשיעור ROR עם DNase I לעומת עם DNase I			הבדל בשיעור ROR עם DNase I לעומת עם DNase I (לאחר הטיפול)		
		ממוצע	מינ'	מקס'	ממוצע	מינ'	מקס'
נמוך	3	-4.0	-6.0	-1.0	0.7	-1.0	3.0
בינוני	2	-4.5	-7.0	-2.0	1.0	0.0	2.0
גבוה	5	0.4	-1.0	2.0	0.4	-1.0	1.0

16.4 ביצועים קליניים

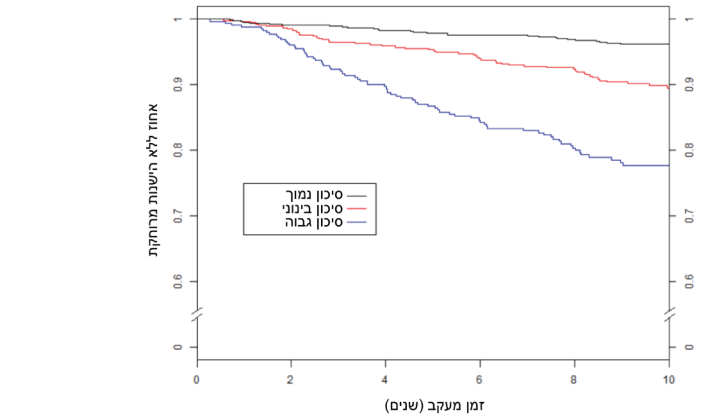
שני מחקרי תיקוף קליני בוצעו כדי לתקף את בדיקת Prosigna של חתימה גנומית לסרטן שד לקביעת מדד פרוגנוסטי. היעד הראשוני של שני המחקרים היה להעניק תוקף לממצאים שפורסמו כי דירוג הסיכון להישנות המחלה (ROR) מספק מידע פרוגנוסטי נוסף לשיעורי הישרדות ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים, הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים. כמו כן, המטרה השניונית משני המחקרים ביקשה לתקף ממצאים קודמים שמטופלות בעלות גידולים מסוג Luminal A ו-Luminal B הן בעלות שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים שהנו שונה מבחינה סטטיסטית. מאחר שקריטריוני ההזנה והתוצאות של שני המחקרים היו דומים, שני מסדי הנתונים שולבו ונותחו באמצעות תוכנית אנליזה מוגדרת בצורה פרוספקטיבית (מתוך ראייה לעתיד), אשר כללה יעדים זהים למחקר.

ניתוח משולב: יצירת עקומת סיכון בעזרת תוצאות משולבות של הבדיקה של Prosigna מהמחקרים TransATAC ו-ABCSG-8

ניתן למצוא סיכום של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים בניתוח המשולב בהמשך העלון. לתכנון המחקר ולפרטי הניתוח בכל מחקר, עיין בסעיפים הבאים עבור מחקרים 1 ו-2, בהתאמה.

לפי קבוצות סיכון. בקבוצת המטופלות עם מצב קשריות חיובי היו מעט מאוד מטופלות בקבוצת המוגדרות מראש של סיכון נמוך, אשר גרמו לרווח בר-סמך בעקומת Kaplan-Meier (KM), ולכן הובילו לאומדן מאוד רחב של שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS) בטווח של 10 שנים.

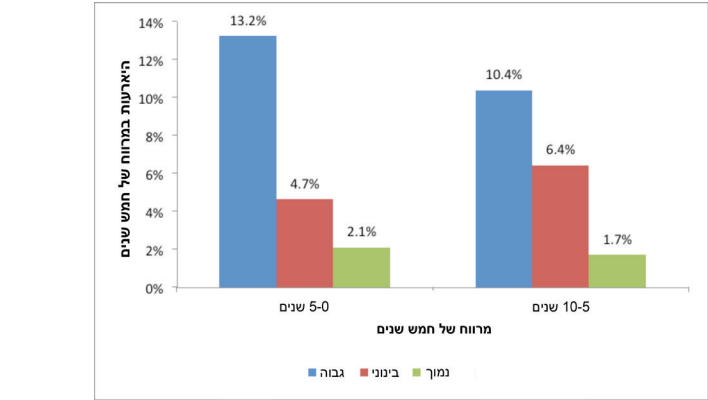
איור DRFS: 16A לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי



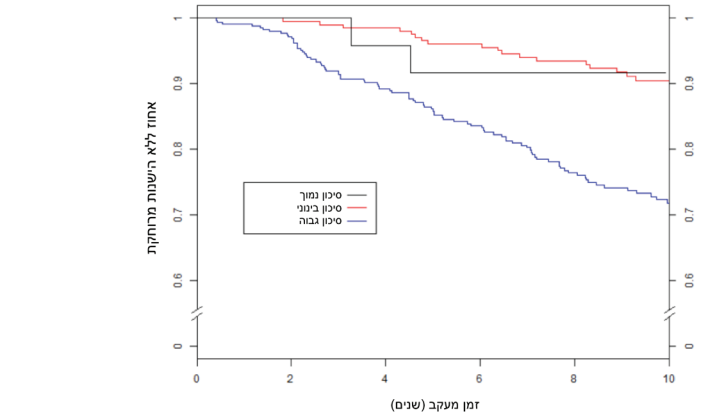
סיכום נתונים עבור איור DRFS: 16A לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	875 (49%)	31	96.2% [97.3% - 94.7%]
בינוני	551 (31%)	53	89.2% [91.7% - 86.1%]
גבוה	360 (20%)	73	77.7% [81.9% - 72.8%]
סה"כ	1,786 (100%)	157	

איור 16B: היארעות לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי במרווחים של חמש שנים



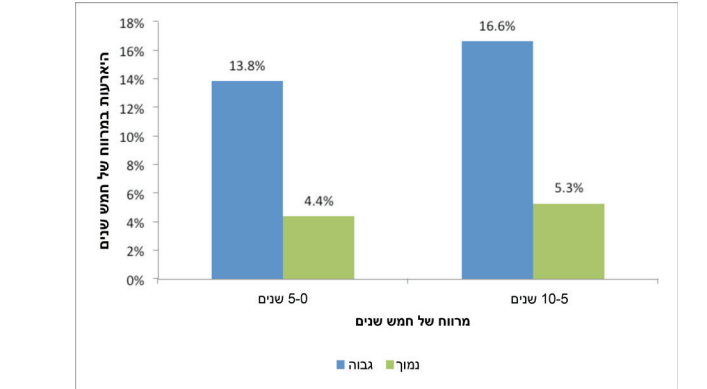
איור DRFS: 17A לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות נגועות



סיכום נתונים עבור איור DRFS: 17A לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות נגועות

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

איור 17B: היארעות לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) במרווחים של חמש שנים



באיור 17B, מאחר שהיו רק 24 מטופלות עם 2 אירועים בקבוצת הסיכון הנמוך עם מצב הקשריות החיובי, מטופלות אלה שולבו עם המטופלות בסיכון בינוני לניתוח ההישרדות המאוחרת.

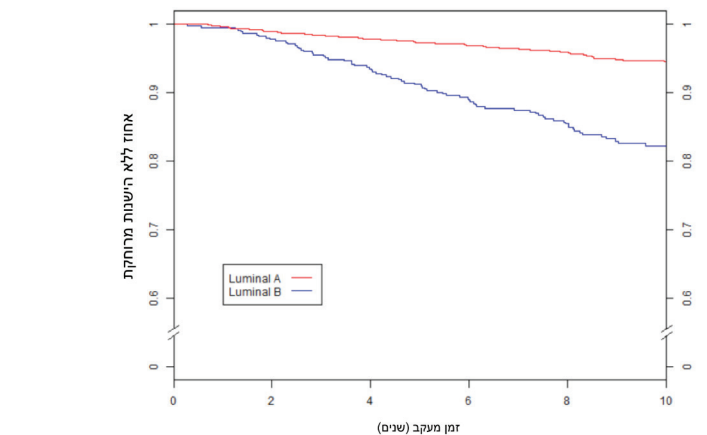
כל 103 המטופלות במסד הנתונים המשולב, שהיו בעלות 4 קשריות נגועות ומעלה, מסווגות כבעלות סיכון גבוה. טבלה 20 מציגה את שיעורי ה-DRFS בטווח של עשר שנים עבור מטופלות אלה.

טבלה 20: שיעורי DRFS בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות עם 4 קשריות נגועות ומעלה

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

מרבית הנבדקות במחקרים המשולבים (96%) השתייכו לתת-הסוג Luminal A או Luminal B. איור 18 מציג השוואה של DRFS לפי תת-סוג לומינלי בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי.

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

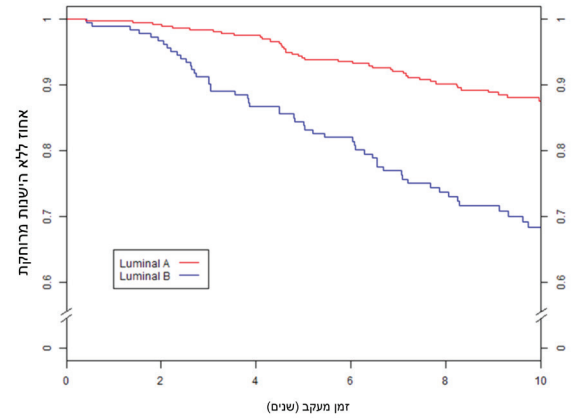


סיכום נתונים עבור איור 18 עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
Luminal A	1254	62	94.6 [95.8 - 93.1]
Luminal B	460	75	81.9 [85.3 - 77.7]
סה"כ	1,714	137	

איור 19 מציג את אותה השוואה עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות נגועות. בשתי הקבוצות התגלו הבדלים מובהקים בין שיעור ה-DRFS בקרב מטופלות עם תת-סוג Luminal A ו-Luminal B.

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



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

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

במסד הנתונים המשולב היו רק 98 מטופלות שהשתייכו לתת-הסוג הלומינלי עם 4 קשריות נגועות ומעלה. טבלה 21 מציגה את שיעורי ה-DRFS בטווח של עשר שנים עבור מטופלות שהן בעלות סיכון גבוה הרבה יותר כאשר הן משתייכות לתת-הסוג Luminal B.

טבלה 21: שיעורי DRFS בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות בעלות 4 קשריות נגועות ומעלה, עם תת-סוג לומינלי

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

ניתוח הישנות מאוחרת

בנתוני הניתוח המשולב שתוארו לעיל, שיעורי האירועים בתוך כל קבוצת סיכון אינם קבועים לכל אורך 10 השנים, כפי שניתן לראות באיורים 16B ו-17B. כדי להבין טוב יותר את ה-DR בתקופות ההישנות המאוחרת, נערכה אנליזה פוסט-הוק רטרופקטיבית של הנתונים המשולבים שתוארו לעיל, בקרב תת-קבוצה של מטופלות שלא חוו הישנות מרוחקת במשך חמש 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 נגועות). עבור כל קבוצת קשריות, הערכים שמתחת לציר ה-X בשנה 5 באיורים 20 ו-21 מציגים את מספר המטופלות לפי קבוצת סיכון, הנמצאות בסיכון בטווח של חמש שנים, כלומר זכאיות להיכלל בניתוח ההישנות המאוחרת.

טבלה 22 מספקת סיכום של מאפייני הטיפול והמאפיינים הקליניים עבור המטופלות בעלות מצב קשריות שלילי ומצב קשריות חיובי (3-1 קשריות נגועות) בניתוח ההישנות המאוחרת.

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

מאפיין	ערך	מצב קשריות שלילי (n = 1,605)		מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) (n = 488)	
		TransATAC (n = 177)	ABCSG8 (n = 311)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 944)
טיפול	מעט אנסטרוזול (Anastrozole)	89	153	346	480
	טמוקסיפן בלבד (Tamoxifen)	88	158	315	464
שלב	טוב	36	46	158	192
	בינוני	105	265	394	752
	ירוד	36	0	109	0
גודל הגידול	≥ 3 ס"מ	11	35	116	204
	2-1 ס"מ	74	165	376	526
	3-2 ס"מ	64	90	139	183
	< 3 ס"מ	28	21	30	31
מצב HER2	שלילי	157	300	590	888
	חיובי	20	11	71	56
סוגי הישנות	מרוחקת	29	28	40	41
	כל הישנות	37	37	78	71
תת-סוג פנימי של NanoString	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 לאמוד את היכולת של דירוג ה-ROR לספק מידע פרגנוסטי נוסף חשוב לשיעורי הישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS), הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים בין השנים 5 עד 10. מודל Null שכלל CTS בלבד הושווה למודל חלופי שכלל CTS ו-ROR בעזרת מבחן יחס ניראות (LR). שיעור ה-ROR הוסיף מידע חשוב מבחינה סטטיסטית לשיעורי ה-DRFS לאחר 5 שנים, הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים עבור כל המטופלות ($p < 0.0001$), וכן עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי ($p < 0.0001$) ועם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) ($p < 0.0001$).

טבלה 23 מציגה סיכום של יחסי הסיכון בשינוי של 10 נקודות המבוסס על אנליזה עם משתנה אחד (univariate) ואנליזה מרובת-משתנים (multivariate) אשר כללה הן את דירוג ה-ROR והן את ה-CTS. יחסי הסיכון עבור דירוג ה-ROR שונים כולם באופן מובהק מ-1 גם לאחר התאמה עבור CTS. מדדי C מוצגים גם בטבלה 22. בשתי הקבוצות, מדד ה-C היה שונה באופן מובהק מהערך חסר המידע של 0.5.

טבלה 23: סיכום של בדיקת הישנות מאוחרת

מספר קשריות נגועות	N	יחס סיכון: שינוי של 10 נקודות בדירוג ה-ROR		מדד C עם 95% רווח בר-סמך		
		אנליזה בעלת משתנה אחד	אנליזה מרובת משתנים	מדד C	תחתון	עליון
0	1,605	1.38 [1.54-1.23]	1.29 [1.46-1.15]	70.1%	64.7%	75.5%
3-1	488	1.43 [1.63-1.25]	1.34 [1.53-1.16]	71.1%	64.0%	78.3%

מרבית המטופלות בשני המחקרים היו בעלות ביטוי שלילי של HER2. טבלה 24 מציגה את ההתפלגות של מצב HER2 בקרב המטופלות בעלות מצב קשריות שלילי ומצב קשריות חיובי (3-1 קשריות). בשתי הקבוצות, מעל ל-90% מהנשים במחקרים היו בעלות ביטוי שלילי של HER2.

טבלה 24: התפלגות של מצב HER2 לפי מספר הקשריות הנגועות

תת-קבוצה של מטופלות	מצב HER2		סה"כ
	שלילי	חיובי	
מטופלות עם מצב קשריות שלילי	1,478 (92.1%)	127 (7.9%)	1,605
מטופלות עם מצב קשריות חיובי עם 3-1 קשריות נגועות	457 (93.6%)	31 (6.4%)	488

טבלה 25 מציגה השוואה בין המודל מרובה המשתנים המותאם לכל המטופלות בקבוצת קשריות נתונה לבין המודל המותאם לכל המטופלות בעלות ביטוי שלילי של HER2 בקבוצה. אין הבדלים מובהקים מבחינה סטטיסטית.

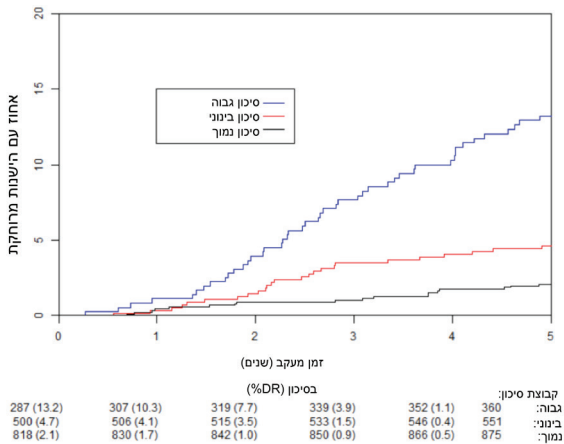
טבלה 25: יחסי הסיכון מרובי המשתנים לשינוי של 10 נקודות בדירוג ה-ROR: כל המטופלות בתוך תת-קבוצה לעומת מטופלות בעלות ביטוי שלילי של HER2 בתוך תת-הקבוצה

מספר של קשריות נגועות	כל המטופלות [95% CI]	מטופלות בעלות ביטוי שלילי של HER2 [95% CI]
מטופלות עם מצב קשריות שלילי	1.29 [1.46-1.15]	1.35 [1.54-1.19]
מטופלות עם מצב קשריות חיובי עם 3-1 קשריות נגועות	1.34 [1.53-1.16]	1.29 [1.50-1.11]

ההשוואה בין קבוצות סיכון מופיעה גם באיורים 20 ו-21, אשר מציגים עקומות היארעות להישנות מרוחקת מוקדמת ומאוחרת שנבנו לפי קבוצות סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי ומצב קשריות חיובי (3-1 קשריות). בהתאמה. עקומות ההיארעות מכסות את תקופת ההישנות המוקדמת (ב-5 השנים הראשונות) ואת תקופת ההישנות המאוחרת (בין 5 עד 10 שנים לאחר הדיאגנוזה). מתחת לציר X מציגים האיורים את מספר הנשים בסיכון ואת ההיארעות המצטברת. טבלאות הסיכונים מתחת לאיורים מציגות את רמות הסמך עבור שיעור ה-DR המצטבר בטווח של 5 שנים או 10 שנים בקרב נשים שלא חוו הישנות מרוחקת לאחר השלמה של 5 שנות טיפול. בקרב המטופלות בעלות מצב הקשריות החיובי (3-1 קשריות), המוצגות באיור 21, קבוצות הסיכון "נמוך" ו"בינוני" שולבו עקב מספר המטופלות הקטן שהשתייך לקבוצת הסיכון "נמוך".

אוכלוסיית הסיכון הנמוך מגלה הסתברות נמוכה להישנות בין השנים 5 ו-10 לאחר 5 שנות טיפול אנדוקריני, כפי שמופיע בעקומות ההיארעות המצטברת ויחסי הסיכון הקשורים עבור כל קבוצת סיכון. ובניגוד לכך, אוכלוסיות הסיכון הבינוני והגבוה הן בעלות סיכון עקבי להישנות מרוחקת מאוחרת לאחר 5 שנות טיפול אנדוקריני. ההבדל בתוצאות בין אוכלוסיות בעלות סיכון בינוני וגבוה, ומצב קשריות שלילי, מתגלה ב-5 השנים הראשונות (שיעור $DR = 13.2\% - 9.6\%$ [6.7% - 9.6%]) בקרב מטופלות עם סיכון גבוה ו-4.7% - 2.9% [6.4% - 2.9%] בקרב מטופלות עם סיכון בינוני) והוא נמשך עד לטווח של 10 שנים; עם זאת, שיעורי ההישנות עבור קבוצות הסיכון הבינוני והגבוה לאחר 5 שנות טיפול אנדוקריני מאוד דומים.

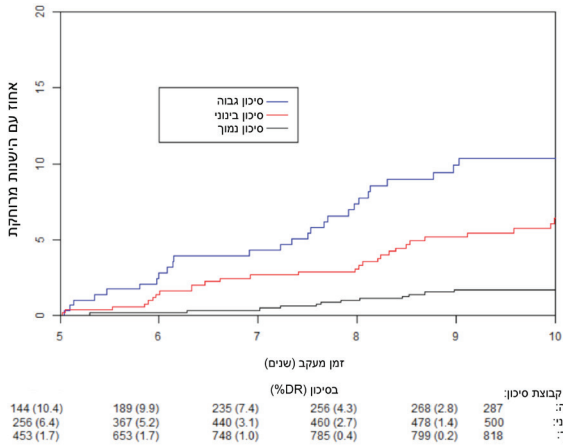
איור 20A: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשריות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 20A: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשריות שלילי

מצב DR לפי קבוצת סיכון עד להשלמה של חמש שנות טיפול		
[רמות סמך של 95%]		
נמוך	בינוני	גבוה
2.1% [3.1% - 1.1%]	4.7% [6.4% - 2.9%]	13.2% [16.7% - 9.6%]

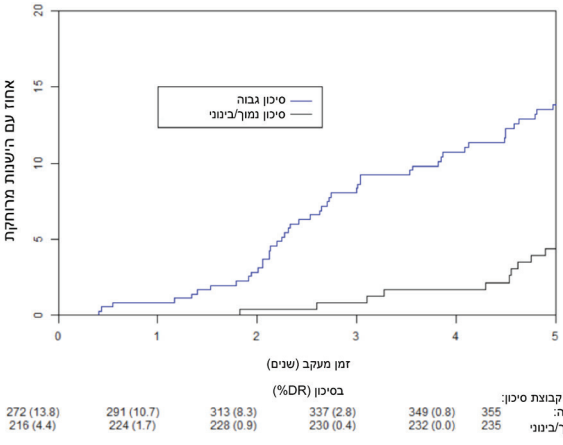
איור 20B: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשריות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 20B: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשריות שלילי

שיעורי DR לפי קבוצת סיכון חמש שנים לאחר השלמת הטיפול ללא הישנות מרוחקת		
[רמות סמך של 95%]		
נמוך	בינוני	גבוה
1.7% [2.6% - 0.8%]	6.4% [8.7% - 4.1%]	10.4% [14% - 6.6%]

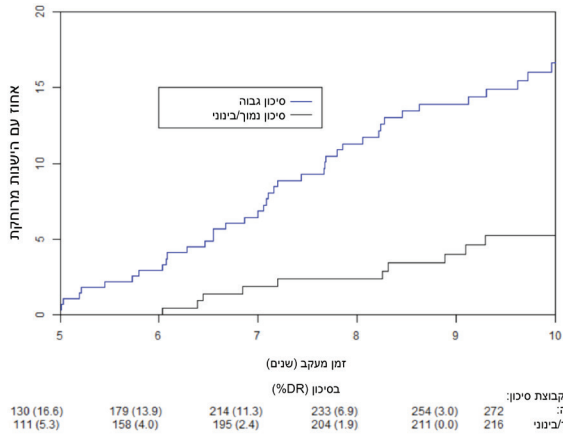
איור 21A: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכום נתונים עבור איור 21A: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-0 שנים: מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)

מצב DR לפי קבוצת סיכון עד להשלמה של חמש שנות טיפול	
[רמות סמך של 95%]	
נמוך / בינוני	גבוה
4.4% [7.0% - 1.7%]	13.8% [17.4% - 10.1%]

איור 21B: עקומות היארעות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 5-10 שנים: מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכום נתונים עבור איור 21B: עקומות הישרדות להישנות מרוחקת לפי קבוצת סיכון בטווח שבין 10-5 שנים: מטופלות עם מצב קשריות חיובי (1-3 קשריות)

שיעורי DR לפי קבוצת סיכון חמש שנים לאחר השלמת הטיפול ללא הישנות מרוחקת	
[רמות סמך של 95%]	
גובה	נמוך / בינוני
16.6% [11.7% - 21.3%]	5.3% [2.0% - 8.4%]

מסקנות הניתוח המשולב

הוכח כי ציון ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי משמעותי בתקופת ההישנות המאוחרת בין 5 ל-10 שנים לאחר האבחון ומעל למשתנים קליניים סטנדרטיים במחקר המשולב עבור חולים שהיו ללא הישנות ממרחק עד חמש שנים. באמצעות קבוצות סיכון המוגדרות ברמת הבסיס עבור כל אחד מהקוהורטים בעלי הספירה הספציפית של הקשריות, הוכח כי קבוצות הסיכון מחלקות את כל המטופלות לקבוצות בעלות סיכון שונה באופן מובהק להישנות מרוחקת מאוחרת. הן הניתוח הרצוף והן הניתוח של קבוצות הסיכון המבוססות על דירוג ROR הוביל למידע פרוגנוסטי דומה בתת-קבוצות שונות. לא התגלו הבדלים מהותיים בין התוצאות המבוססות על מטופלות בעלות ביטוי שלילי של HER2 לבין אלה המבוססות על כל המטופלות.

במחקר TransATAC ובמחקר ABCSG-8, הוכח כי ה-ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק הרבה מעבר למשתנים הקליניים והטיפולים הסטנדרטיים, הן כשהוא נכלל כמדד רצוף והן כשהוא נכלל בעזרת שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. לשני המחקרים היו פרופילי סיכון שונים כאשר שיעור האירועים היה גבוה יותר במחקר TransATAC מאשר במחקר ABCSG-8: ניתן לראות זאת בבירור בעת השוואת ה-DRFS (%) (ברווחות הבקרה של ATAC 90.8% ו-ABCSG8 92.5%) שעליו דווח בספרות¹⁰. ניתוח זה שילב בין הנתונים משני המחקרים, כאשר לכל אחד מהם ניתן משקל זהה, כדי ליצור פרופילי סיכון שהיו ניתנים יותר להכללה עבור אוכלוסיות אחרות של מטופלות מאשר תוצאות מהמחקרים הבודדים.

מחקר 1: חיזוי הסיכון להישנות מרוחקת בנשים לאחר גיל המעבר עם סרטן שד מוקדם, בעל גידולי קולטן הורמון חיובי ומצב קשריות שלילי או חיובי, המטופלות בארימידיקס או בטמוקסיפן: מחקר TransATAC

תכנון המחקר

מחקר התיקוף הקליני נועד לאמת כי דירוג הסיכון להישנות המחלה (ROR) מספק מידע פרוגנוסטי נוסף עבור שיעורי הישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS) הרבה מעבר למשתנים קליניים סטנדרטיים, תוך שימוש בכל דגימות המטופלות הזמינות. מחקר זה השתמש ב-RNA שערב הליך בידוד מרקמת גידול סרטן השד שקובעה בפורמלין ונשמרה בתוך פרפין (FFPE), מתת-קבוצה של המטופלות שהשתתפו בניסוי ATAC¹¹. ניסוי ATAC כלל 9,366 מטופלות בשלוש זרועות ניסוי (1:1:1), שבהן המטופלות עברו רנדומיזציה לצורך קבלת טיפול אנדוקריני למשך 5 שנים של מ"ג אחד של אנסטרוזול (כלומר ארימידקס) בנוסף לפלצבו של טמוקסיפן, 20 מ"ג של טמוקסיפן בנוסף לפלצבו של אנסטרוזול, או שילוב של טמוקסיפן/ארימידקס. קבוצת הטיפול המשולב הופסקה לאחר הניתוח הראשוני משום שהתגלה כי אין לה יתרונות מבחינת יעילות או עמידות על פני הטיפול בטמוקסיפן בלבד. לאחרונה, דווח כי מעקב חיצוני של 10 שנים של זרועות הטיפול היחיד של ניסוי ATAC עמדו בדרישות ה-FDA מבחינת מידע מעודכן של בטיחות ויעילות⁹. עבור מטופלות בעלות גידולי קולטן הורמון חיובי, היה שיפור מובהק מבחינת DFS (HR = 0.86, P = 0.001) RFS (HR = 0.79, P = 0.001) עבור אותן מטופלות שטופלו באנסטרזול בהשוואה לטמוקסיפן בניתוח זה. ההבדלים האבסולוטיים בשיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת בין אנסטרוזול לטמוקסיפן הלכו וגדלו לאורך זמן מ-2.7% לאחר 5 שנים ל-4.3% בטווח של 10 שנים. פרויקט TransATAC החל לפעול ב-2002 במסגרת פרוטוקול TA/01, במטרה להקים בנק רקמות מבלוקים היסטופתולוגיים ארכיוניים של פרפין (FFPE) ממטופלות ATAC בצורה רטרופקטיבית¹¹.

בסך הכול הושגו 2,006 בלוקים מ-4,160 נשים עם סרטן שד בעל גידולי קולטן הורמון חיובי, אשר עברו רנדומיזציה במסגרת זרועות הטיפול היחיד של ניסוי ATAC. מתוך אותם בלוקי FFPE, 1,372 נאספו ממטופלות בבריטניה והכילו גידולים פולשניים מספיק לצורך ניתוח באמצעות בדיקת Oncotype Dx[®] Genomic Health[®]. דירוג Oncotype Dx[®] Recurrence Score[®] (RS) נקבע באמצעות בלוקי ה-FFPE, ותוצאות המחקר סיפקו תוקף קליני ל-RS לצורך הערכת שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת בקרב מטופלות לאחר גיל המעבר עם סרטן שד בעל גידולי קולטן הורמון חיובי, המטופלות באנסטרזול או בטמוקסיפן. ה-RNA הנותר ממחקר Oncotype Dx נשלח לבית החולים Marsden Hospital בלונדון, ושם אוסחו בטמפרטורה של 70°C- ל-1,017 מטופלות בסך הכול ממחקר Oncotype Dx נשארו מעל 500 נ"ג של RNA, והן נבדקו על-ידי NanoString כחלק ממחקר התיקוף הקליני של NanoString.

במחקר זה נעשה שימוש בתת-הסוגים הפנימיים שסיפקה הבדיקה, והוא בחן שתי גרסאות של דירוג ה-ROR באמצעות גישה סדרתית מוגדרת מראש. שני הדירוגים השונים של ROR, כל אחד מהם בטווח של 0-100, חושבו באמצעות כל 50 הגנים לבדיקה כפי שפורסם בעבר² או באמצעות תת-קבוצה של 46 גנים. בכל אחד מהמקרים, המקדמים חושבו ממודל קוקס הכולל את מתאם פירסון עבור 50 או 46 הגנים לצורך חישוב כל תת-סוג פנימי, שיעור התרבות וגודל גידול. כל הניתוחים בוצעו בנתוני מעקב של 10 שנים.

נקודת הסיום הראשית הייתה שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מהאבחון ועד להישנות מרוחקת או למוות כתוצאה מסרטן השד. נקודת הסיום המשנית הייתה שיעור הישרדות ללא הישנות (RFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מהאבחון ועד להישנות הראשונה (מקומית, אזורית או מרוחקת) או למוות כתוצאה מסרטן השד.

באמצעות כל דגימות המטופלות הזמינות, הוכנו מודלים מרובי משתנים של סיכון פרופורציונלי (PH) מסוג קוקס כדי להעריך את היעד הראשוני בבדיקות סדרתיות של ROR בהתבסס על 50 ו-46 גנים. המודל כלל את המשתנים המתואמים הקליניים הסטנדרטיים (גיל, שלב הגידול, גודל הגידול, מצב הקשריות, טיפול משלים (אד'ובנטי)). לאחר מכן נוצר מודל קוקס ונעשה שימוש בבדיקת יחס ניראות כדי לבחון אם ה-ROR הוסיף מידע פרוגנוסטי נוסף בעל מובהקות סטטיסטית ($\alpha = 0.05$). הרבה מעבר לכלול בדירוג הטיפול הקליני (CTS). דירוג CTS הוא שילוב ממוטב של גורמים קליניים-פתולוגיים שפותחו על-ידי החוקר הקליני למדידת פתולוגיה סטנדרטית¹². ניתוחי הנתונים הראשיים בוצעו שוב עבור תת-קבוצות שונות של מטופלות (כולן, מצב קשריות שלילי, מצב קשריות חיובי או מצב HER2 שלילי בלבד) ונקודות קצה (DRFS או RFS).

עבור כל אחת מהמטופלות בעלות מצב קשריות שלילי או חיובי, נעשה שימוש במודלי קוקס (פרט ל-CTS) כדי לחזות את הסיכון בטווח של 10 שנים להישנות מרוחקת (DR) כפונקציה של מידת הסיכון להישנות המחלה (ROR). בהתבסס על תחזיות אלה של המודלים, הוגדרו שלוש קבוצות סיכון בצורה הבאה:

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

ניתוח

אומדי Kaplan-Meier (KM) נוצרו עבור כל קבוצות סיכון. בדיקות יחס ניראות (המשמשות להשוואת ההתאמה של שני מודלים סטטיסטיים), כמתואר בניתוח הראשי, בוצעו עבור בדיקת Oncotype Dx של Genomic Health (RS), דירוג הישנות) ובדיקת החוקר הראשי המבוססת על אימונוהיסטוכימיה (IHC4). תוצאות אלה הושאו לתוצאות שהושגו עבור ROR לקביעת המידה שבה כל מערכת דירוג מספקת מידע פרוגנוסטי נוסף הרבה מעבר ל-CTS. לא יתבצע דיון נוסף בתוצאות של IHC4 הואיל וקשה להשוות אותן לבדיקות אחרות משום שבדיקת IHC4 בוצעה באמצעות נתוני מחקר TransATAC.

טבלה 26: סיכום נתונים דמוגרפיים ומאפיינים קליניים

מאפיין	מחקר נוכחי (n = 1,007)		מחקר ראשוני שממנו התקבל ה-RNA (n = 1,231)	זרועות תרופה יחידה של ATAC לא נכללו (n = 2,929)
	מספר מטופלות	אחוז מטופלות		
מצב הקשריות				
שלילי	701	70%	71%	68%
חיובי	268	27%	25%	25%
לא ידוע	38	4%	4%	7%
גודל הגידול				
≥ 1 ס"מ	138	14%	67%	70%
2–1 ס"מ	523	52%		
3–2 ס"מ	253	25%	33%	30%
< 3 ס"מ	93	9%		
שלב הגידול				
טוב	213	21%	27%	25%
בינוני	601	60%	57%	59%
ירוד	193	19%	16%	17%
גיל				
ממוצע	64.4		64.3	66.1

טבלה 27: מאפיינים קליניים נוספים

מאפיין	מספר מטופלות	אחוז מטופלות
תת-סוג		
Basal-Like	9	1%
HER2-Enriched	41	4%
Luminal A	692	69%
Luminal B	265	26%
טיפול		
אנסטרזול	513	51%
טמוקסיפן	494	49%
סוגי הישנות		
כל הישנות	210	21%
מרוחקת	160	16%
מצב HER2		
שלילי	888	88%
חיובי	119	12%

תוצאות

הבדיקות של הניתוח הראשי הראו כי דירוג ה-ROR מספק מידע פרוגנוסטי נוסף עבור שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים (CTS). כל נתוני ה-ROR המדווחים שלהלן מבוססים על 46 גנים, הואיל וזהו הבסיס ל-ROR כפי שדווח בבדיקה של Prosigna.

טבלה 28: בדיקות ניתוח ראשי של ROR

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

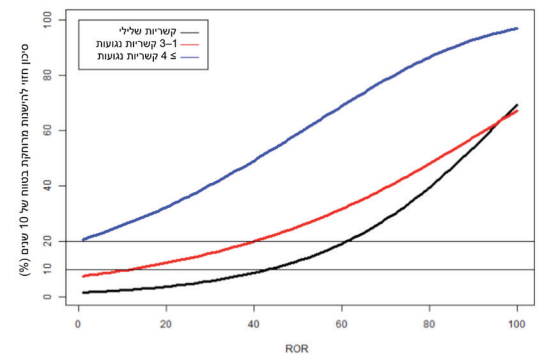
ניתוחי נתונים משניים הראו כי יש קשר מובהק בין ROR לשיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת, וכי הוא מוסיף מידע פרוגנוסטי מעבר ל-CTS בתת-קבוצות רבות בעלות רלוונטיות קלינית.

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

קבוצת נבדקות	נקודת קצה	מספר מטופלות	מספר אירועים	CTS+ROR מול CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-value
כולן	DRFS	160	34.2	34.2	0.0001 >
	RFS	1007	31.2	31.2	0.0001 >
	DRFS	888	28.9	28.9	0.0001 >
בטיסו שלילי של HER2	RFS	888	26.9	26.9	0.0001 >
	DRFS	739	25.0	25.0	0.0001 >
	RFS	739	21.5	21.5	0.0001 >
מצב קשריות שלילי	DRFS	268	9.3	9.3	0.0023
	RFS	268	10.6	10.6	0.0011
מצב קשריות חיובי	DRFS	649	24.6	24.6	0.0001 >
	RFS	649	20.8	20.8	0.0001 >

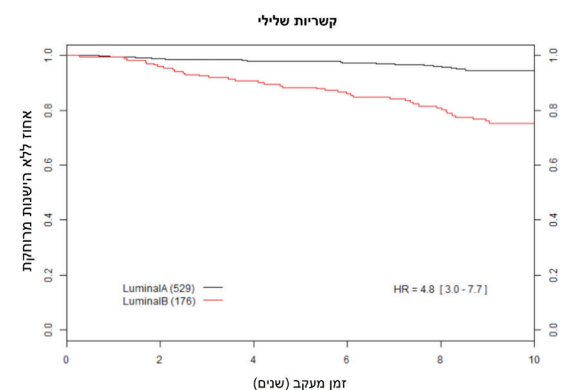
ניתוחי נתונים ראשיים ומשניים הוכיחו כי קיים קשר רצוף בין ROR ל-DRFS בכל המטופלות ובכל תת הקבוצות.

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

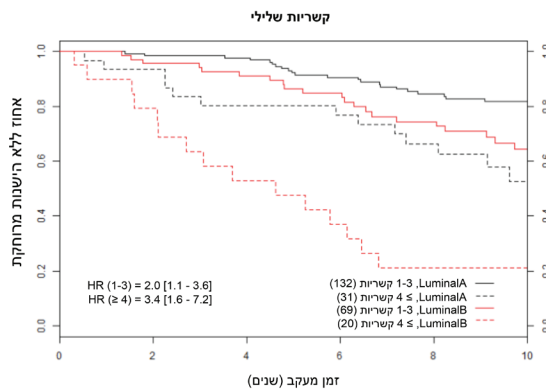


ניתוחי נתונים משניים מראים כי לתת הסוגים Luminal A ו-Luminal B היו תוצאות שונות באופן מובהק מבחינה סטטיסטית במסגרת כל תת-קבוצה של מטופלות המוגדרת לפי מצב הקשריות.

איור 23: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי לפי תת-סוג פנימי

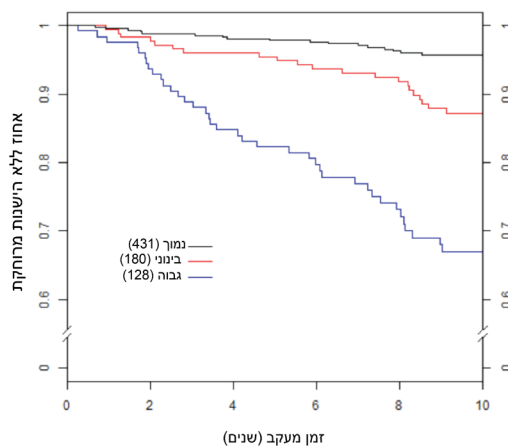


איור 24: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS עבור מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי לפי תת-סוג פנימי



איורים 25 ו-26 מראים שבמסגרת כל קטגוריה של קשריות, הסיכון הקליני המוחלט של אותן מטופלות בעלות תחזית של סיכון נמוך היה שונה באופן מהותי מהסיכון הקליני המוחלט של המטופלות בעלות התחזית של סיכון גבוה: המטופלות בעלות התחזית של הסיכון הנמוך הציגו שיעורי DR בטווח של 10 שנים של פחות מ-10%, ואילו המטופלות בעלות התחזית של הסיכון הגבוה הציגו שיעורי DR בטווח של 10 שנים של יותר מ-30%.

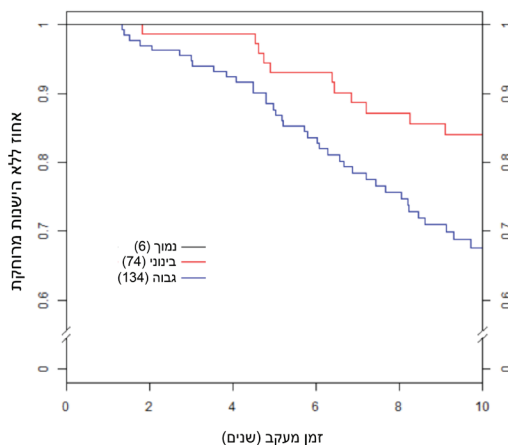
איור 25: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי ללא CTS



סיכום נתונים עבור איור 25 DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי ללא CTS

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	431 (58%)	17	96% [94% - 98%]
בינוני	180 (24%)	22	86% [81% - 92%]
גבוה	128 (17%)	38	67% [59% - 76%]
סה"כ	739 (100%)	77	

איור 26: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם 3-1 קשריות חיוביות ללא CTS



סיכום נתונים עבור איור DRFS 26 לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם 3-1 קשריות חיוביות ללא CTS

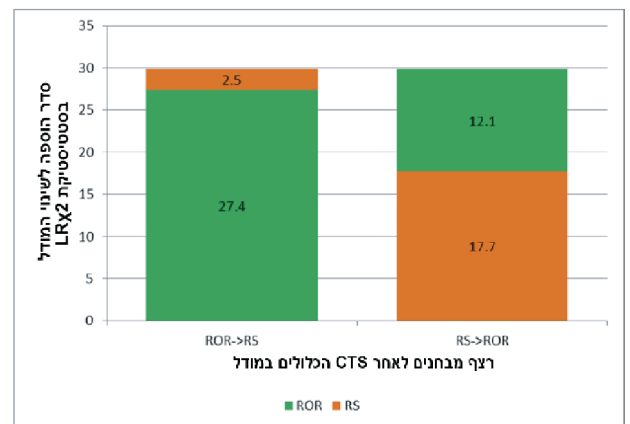
קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	6 (3%)	0	100% [לא זמין]
בינוני	74 (35%)	11	84% [76% - 93%]
גבוה	134 (63%)	38	68% [59% - 77%]
סה"כ	214 (100%)	49	

השוואה של ROR עם RS

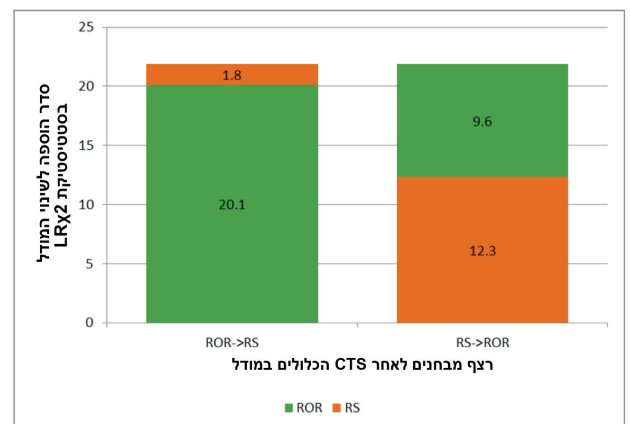
מתוך 1,007 הדגימות עם דירוגי ROR, תוצאות בדיקת Oncotype Dx היו זמינות עבור כל 1,007 הדגימות, אך תוצאות IHC היו זמינות רק עבור 940 דגימות. כדי לאפשר השוואה של כל שלוש הבדיקות, התוצאות בסעיף זה מבוססות על 940 הדגימות שהיו להן תוצאות בדיקות עבור כל שלוש השיטות (עם זאת, לא נכלל כאן דיווח על IHC4). בדיקות יחס הניראות מוצגות לצורך הוספת משתנה בודד, ולכן כדי שלמידע הנוסף תהיה מובהקות סטטיסטית ($\alpha = 0.05$), השינוי בנתון הסטטיסטי של דרגת חופש אחת χ^2 חייב להיות גדול מ-3.84. האירועים הבאים מציגים את המידע שנוסף בעת הוספת הבדיקה הפרוגנוסטית לבדיקה פרוגנוסטית אחרת בנוסף ל-CTS ברצף. בכל אחת מהתוספות, המידע שנוסף נמדד לפי השינוי ב- χ^2 .

ROR שנוסף ל-RS בנוסף ל-CTS: מידע פרוגנוסטי

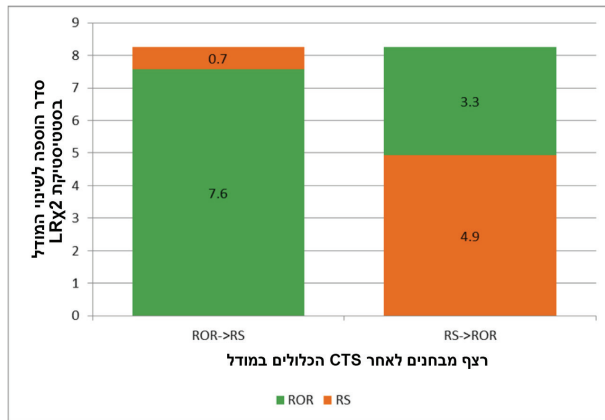
איור 27: מידע פרוגנוסטי לשיעור DRFS מעבר ל-CTS בקרב כל המטופלות (n = 940)



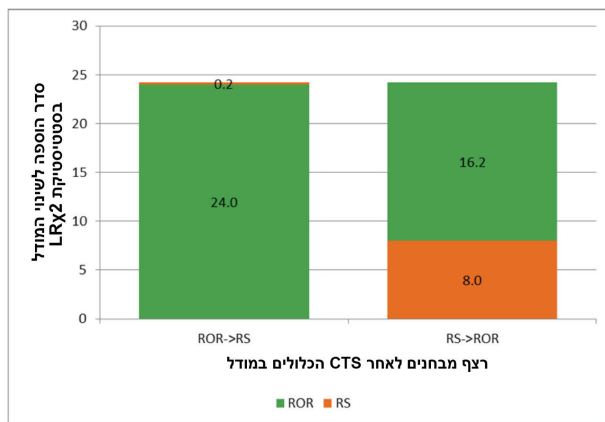
איור 28: מידע פרוגנוסטי לשיעור DRFS מעבר ל-CTS בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי (n = 683)



איור 29: מידע פרוגנוסטי לשיעור DRFS מעבר ל-CTS בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (n = 257)



איור 30: מידע פרוגנוסטי לשיעור DRFS מעבר ל-CTS בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי וביטוי שלילי של HER2 (n = 649)



אירועים 27 עד 30 מציגים את המידע שנוסף מעבר ל-CTS כאשר שתי הבדיקות הפרוגנוסטיות נוספות ברצף. בכל אחת מהתוספות, המידע שנוסף נמדד לפי השינוי בנתון הסטטיסטי χ^2 . לדוגמה, כאשר ROR היה הבדיקה הראשונה שנוספה לאחר הכללת CTS (כל נתוני המטופלות), השינוי בנתון הסטטיסטי χ^2 היה 27.4. עם CTS ו-ROR במודל, הוספת RS הביאה לשינוי בנתון הסטטיסטי χ^2 של 2.5, שאינו שינוי מובהק (הערך הקריטי עבור בדיקת χ^2 עם דרגת חופש אחת הוא 3.84); כלומר, כאשר CTS ו-ROR נמצאים במודל, RS אינו מוסיף מידע בעל מובהקות. עם זאת, כאשר RS היה הבדיקה הראשונה שנוספה, עדיין היה מידע כלול ב-ROR שלא נכלל בשילוב של CTS ו-RS. שתי הבדיקות הציגו מובהקות פרוגנוסטיות כשנוספו ל-CTS בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי, אך אף אחת מהבדיקות לא הציגה מובהקות בתור הבדיקה השנייה שנוספה עקב כמות הדגימות הקטנה יותר. עבור תת הקבוצה של מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי וביטוי שלילי של HER2, RS אינו מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק ל-CTS + ROR. מצד שני, ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק ל-CTS + RS.

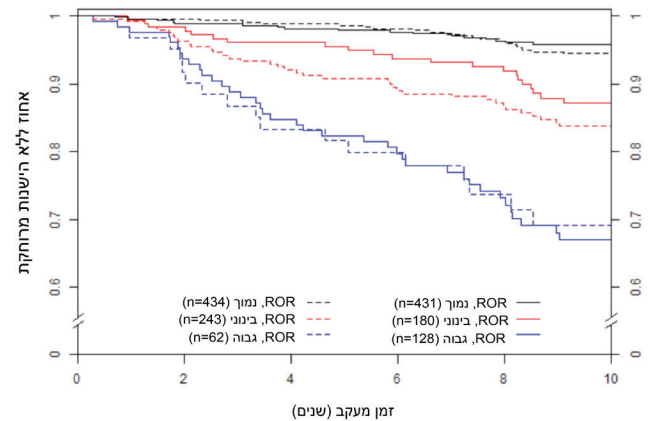
ROR מול RS: תוצאות של קבוצות סיכון

על מנת להשוות כיצד שתי הבדיקות הפרידו בין המטופלות בהתאם לסיכון, הוגדרו קבוצות סיכון בהתבסס על הערכת הסיכון של כל אחת מהבדיקות להישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים באוכלוסיית TransATAC. ערכי הסף של דירוג הסיכון להגדרת קבוצות הסיכון נבחרו עבור כל בדיקה בהתבסס על התוצאות של מחקר TransATAC כדי להגדיר קבוצות סיכון הכוללות מטופלות בעלות אותו סיכון. כדי להשיג קבוצות סיכון ניתנות להשוואה, נקודות הסף אשר שימשו את המחקר Oncotype DX היו שונות מהנקודות אשר שימשו את Genomic Health. עבור כל בדיקה, קבוצת הסיכון הנמוך הוגדרה באופן פרוספקטיבי כמטופלות בעלות סיכון משוער קטן מ-10% להישנות המחלה. עבור כל בדיקה, קבוצת הסיכון הבינוני הוגדרה באופן פרוספקטיבי כמטופלות בעלות סיכון משוער הנע בין 10% ל-20% להישנות המחלה. עבור כל בדיקה, קבוצת הסיכון הגבוהה הוגדרה באופן פרוספקטיבי כמטופלות בעלות סיכון משוער גדול מ-20% להישנות המחלה. האירוע להלן מסכם את הגדלים ואת התוצאות של קבוצות הסיכון שהוגדרו על-ידי כל אחת מהבדיקות.

איור 31 מציג את התוצאה לפיה Prosigna הקצתה פחות מטופלות בשיעור של 26% לקבוצת הסיכון הבינוני לעומת Oncotype DX (180 מטופלות לעומת 243 מטופלות). כמו כן, Prosigna הקצתה יותר מטופלות לקבוצת הסיכון הגבוהה לעומת Oncotype DX; עם זאת, קבוצות הסיכון הנמוך והסיכון הגבוה שהוגדרו על-ידי כל אחת מהבדיקות גילו תוצאות דומות, כמתואר בעקומות Kaplan-Meier (KM) החופפות. ממצא זה הוביל את החוקרים הבלתי התלויים של המחקר TransATAC למסקנה ש-Prosigna הקצתה פחות

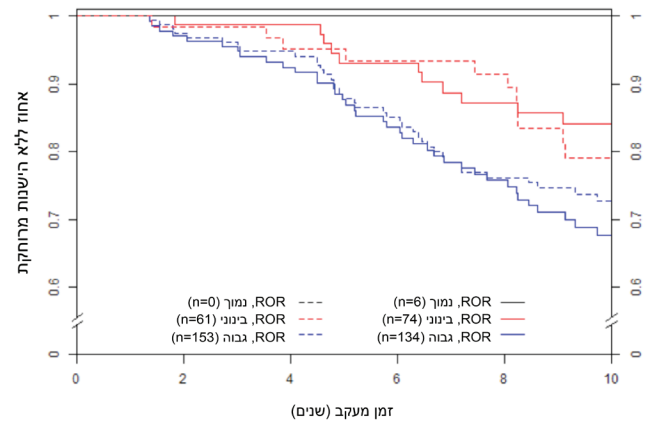
מטופלות לקבוצת הסיכון הבינוני לעומת ה-RS של Oncotype DX, עם הפרדה שווה או גבוהה יותר בין קבוצות הסיכון הנמוך והגבוה.

איור 31: דירוג ה-ROR של Prosigna זיהה, באופן ניכר, מספר רב יותר של מטופלות השייכות לקבוצת הסיכון הגבוה, ומספר קטן יותר של מטופלות השייכות לקבוצת הסיכון הבינוני לעומת דירוג ה-RS של Oncotype DX עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי.



כאשר נעשה שימוש אך ורק בדירוג ROR בקרב מטופלות עם 1-3 קשריות נגועות, נמצאו 6 מטופלות אשר נובא להן סיכון > 10% להישנות מרוחקת. אף אחת מהמטופלות הללו לא חוו אירועים במהלך המחקר. אחת מהמטופלות הללו נצפתה במשך 7.9 שנים וכל האחרות לא חוו DR במשך לפחות 9.9 שנים של מעקב, מה שמעיד על כך שהמטופלות בעלות מצב קשריות חיובי, אשר נובא להן סיכון נמוך, היו אכן בעלות סיכון נמוך. לא נעשה שימוש במבחני דירוג לוג (log-rank) להשוואה, מאחר שלא היתה קבוצת סיכון נמוך עבור RS.

איור 32: השוואה של סיווג קבוצות סיכון ל-DRFS בטווח של 10 שנים מבלי להשתמש ב-CTS: מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (1-3 קשריות) (ROR לעומת RS)



מסקנות של מחקר קליני 1

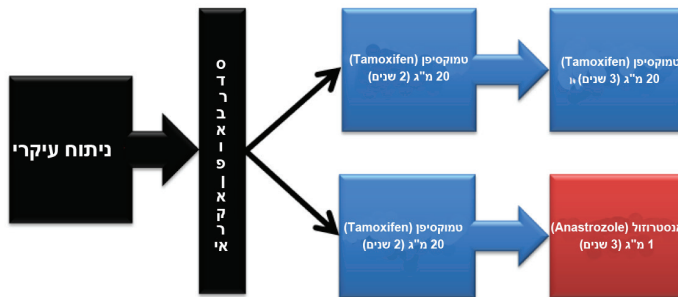
הניתוח הראשי גילה כי שיעור ה-ROR הוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק מעבר למידע שמספקים המשתנים המתואמים הקליניים הסטנדרטיים (CTS) בקרב כל המטופלות, ובכל התת-קבוצות הרלוונטיות מבחינה קלינית, אשר הוגדרו מראש. המחקר גילה כי ה-ROR מחלק את המטופלות ל-3 תת-קבוצות סיכון, המניבות תוצאות שונות מובהקות מבחינה סטטיסטית בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי. הממצאים הראו כי התת-סוגים הפנימיים Luminal A ו-Luminal B כללו שיעורי DRFS ו-RFS שונים באופן מובהק, ללא קשר למצב הקשריות. בהשוואה לסמן הפרוגנוסטי RS (דירוג הישנות ל-21 גנים ב-Oncotype Dx), ה-ROR הוסיף מידע פרוגנוסטי מעבר ל-RS בקרב כל המטופלות, ובתת-קבוצות רלוונטיות מבחינה קלינית. יתרה מכך, בקבוצה בעלת מצב קשריות השלילי, שיעור ה-ROR הכפיל את מספר המטופלות שהוקצו לקבוצת הסיכון הגבוה, והקטין באופן ניכר את מספר המטופלות שהוקצו לקבוצת הסיכון הבינוני, מבלי להקטין את ההבדלים בתוצאות בין קבוצת הסיכון הנמוך לקבוצת הסיכון הגבוה בהשוואה ל-RS.

מחקר 2: פרוגנוזה לנשים לאחר גיל המעבר עם סרטן השד, בעלות גידולי קולטן הורמון חיובי (HR+), המקבלות טיפול אנדוקריני משלים (אדג'ובנטי) מערכתי בלבד, באמצעות הבדיקה של Prosigna: מחקר ABCSG-8

תכנון המחקר

קוהורט המחקר מכיל דגימות רקמה של סרטן שד שקובעו בפורמלין ונשמרו בתוך פרפין (FFPE) שנאספו בעבר ואוחסנו בארכיון במאגר הגידולים ABCSG ממטופלות שנרשמו בין השנים 1996 ו-2004 בניסוי ABCSG-8¹³. 3,901 נשים לאחר גיל המעבר, עם סרטן שד בשלב מוקדם ו-HR+, חולקו באופן אקראי לפני הטיפול. קבוצה אחת קיבלה טיפול אדג'ובנטי ב-3 שנים, Tamoxifen, מלווה בשלוש שנות טיפול ב-Arimidex® (אנסטרזול) וקבוצה אחרת קיבלה חמש שנות טיפול אדג'ובנטי בטמוקסיפן (Tamoxifen). מבנה הטיפול של הניסוי מוצג באיור 33.

איור 33: סכימה של תכנון המחקר ABCSG-8



קוהורט התיקוף מייצג חלק מקוהורט ה-ABCSG הניתן להערכה אשר עבורו ניתן היה לאסוף דגימות רקמה ממאגר הגידולים ABCSG שבארכיון, ואשר עבורו ניתן היה לקבל הסכמה מדעת, או שהמטופלת נפטרה. מטופלות שעמדו בקריטריונים להשתתפות במחקר המקורי הוצאו מהמחקר רק אם הרקמה שלהן לא היתה זמינה לביצוע הבדיקה של NanoString או אם לא ניתן היה לקבל מהן הסכמה מדעת שוב. כל הדגימות בעלות בלוק גידול וכל המטופלות שהסכמתן התקבלה נבדקו כחלק ממחקר זה.

במחקר זה נעשה שימוש בתת-הסוגים הפנימיים שסיפקה הבדיקה, והוא בחן את דירוג ה-ROR באמצעות תוכנית אנליזה מוגדרת מראש. דירוג ה-ROR, שנע בטווח של 0-100, חושב בעזרת תת-קבוצה של 46 גנים מתוך 50 הגנים של הבדיקה שפורסמה בעבר². המקדמים של שיעור ה-ROR חושבו ממודל קוקס הכולל מתאם פירסון עבור 46 הגנים לקביעה של כל תת-סוג פנימי, שיעור התרבות וגודל גידול כולל. כל הניתוחים בוצעו בנתוני מעקב מרביים.

נקודת הסיום הראשית הייתה שיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת (DRFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מהאבחון ועד להישנות מרוחקת או למוות כתוצאה מסרטן השד. נקודת הסיום המשנית הייתה שיעור הישרדות ללא הישנות (RFS). שיעור זה הוגדר בתור מרווח הזמן מהאבחון ועד להישנות הראשונה (מקומית, אזורית או מרוחקת) או למוות כתוצאה מסרטן השד.

באמצעות כל דגימות המטופלות הזמינות, הוכנו מודלים מרובי משתנים של סיכון פרופורציונלי (PH) מסוג קוקס כדי להעריך את היעד הראשוני בבדיקות סדרתיות של ROR. המודל כלל את המשתנים המתואמים הקליניים הסטנדרטיים (גיל, שלב הגידול, גודל הגידול הכולל, מצב הקשריות, טיפול משלים (אדג'ובנטי)). לאחר מכן נוצר מודל קוקס ונעשה שימוש בבדיקת יחס ניראות כדי לבחון אם ה-ROR הוסיף מידע פרוגנוסטי נוסף בעל מובהקות סטטיסטית ($\alpha = 0.05$) הרבה מעבר לכלול בדירוג הטיפול הקליני (CTS). דירוג CTS הוא שילוב ממוטב של גורמים קליניים-פתולוגיים שפותחו למדידת פתולוגיה סטנדרטית¹². ניתוחי הנתונים הראשיים בוצעו שוב עבור תת-קבוצות שונות של מטופלות (כולן, מצב קשריות שלילי, מצב קשריות חיובי או מצב HER2 שלילי בלבד) ונקודות קצה (DRFS או RFS).

ניתוח

המחקר נקט גישה סדרתית לפיה היעד המדעי הראשוני הוא להוכיח כי שיעור ה-ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים. היעד הראשוני הוסיף דרישה נוספת לפיה יש להוכיח כי סיווג הסיכון הקטגוריאלי לאחת משלוש קבוצות (נמוך/בינוני/גבוה) מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים. כדי לעמוד בדרישה זו, אחד מהשניים הבאים דרש הוכחה:

- להוכיח כי דירוג ה-ROR הרצוף מוסיף ערך פרוגנוסטי הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים.
- אם היפותיזה Null, לפיה לא נוסף כל מידע פרוגנוסטי, נדחתה, להוכיח שקטגוריות הסיכון מבוססות ה-ROR מוסיפות ערך פרוגנוסטי הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים.

באמצעות כל דגימות המטופלות הזמינות, הוכנו מודלים מרובי משתנים של סיכון פרופורציונלי (PH) מסוג קוקס כדי להעריך את היעד הראשוני בבדיקות סדרתיות של ROR, מלות בקטגוריות סיכון מבוססות ROR שהוגדרו מראש. המודלים כללו את המשתנים המתואמים הקליניים הסטנדרטיים הקטגוריאליים (עם ערכים אפשריים):

- גיל (≤ 65 או > 65)
- שלב (G1 או G2/GX)
- גודל גידול כולל (T1, T2/T3)
- מצב קשריות (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- טיפול משלים (אדובנטי) (טמוקסיפין (Tamoxifen) בלבד, או טמוקסיפין (Tamoxifen) ← אנסטרוזול (Anastrozole))

כאשר N0 מציין מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי, N+(1-3) מציין מטופלות עם מצב קשריות חיובי עם 1-3 קשריות נגועות, ו-N+(≥ 4) מציין מטופלות עם מצב קשריות חיובי עם 4 קשריות נגועות ומעלה. T1 מציין גידול שגודלו הכולל ≥ 2 ס"מ, T2 מציין גידול שגודלו הכולל ≥ 5 ס"מ אך אינו עולה על 5 ס"מ, ו-T3 מציין גידול שגודלו הכולל ≥ 5 ס"מ. המחקר כלל 14 דגימות משלב T3 בלבד, לכן הן שולבו עם הדגימות משלב T2. נערכה השוואה בין הגידולים הממונים היטב (G1) לשילוב של גידולים ממונים בצורה בינונית (G2) וגידולים לובילריים משלב GX. גידולים לובילריים משלב GX טופלו כגידולי G2 לשם הניתוח משום ששלב G2 הוא השלב השכיח ביותר בקרב אוכלוסיית המטופלות לשימוש המיועד.

המשתנים המתואמים הוזנו במודל בצורה של 'דירוג טיפול קליני' (CTS). כדי להשיג דירוג CTS, הותאם המודל הבא:

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

כאשר סימוני ה-z מייצגים את המשתנים הקליניים והטיפוליים המופיעים לעיל וה-CTS הגדרה באמצעות הערכות של סימוני ה- γ שהושגו לעיל; כלומר, $\sum_j z_j \gamma_j = \text{CTS}$.

הנחת הסיכון הפרופורציונלי נבחנה באמצעות שאריות Schoenfeld.

המטופלות שנכללו במחקר התיקוף גילו מאפיינים דומים לאלה שנכללו במחקר ACBSG-8 המקורי.

טבלה 30: סיכום של מאפיינים קליניים

מאפיין	ערך	כלול (n = 1,478)		לא כלול (n = 2,236)		סה"כ (n = 3,714)	
		%	#	%	#	%	#
טיפול	טמוקסיפין (Tamoxifen) בלבד	50.1%	741	49.3%	1108	49.8%	1,849
	טמוקסיפין (Tamoxifen) ← אנסטרוזול (Anastrozole)	49.9%	737	50.2%	1128	50.2%	1,865
	שלילי	0.9%	14	1.4%	32	1.2%	46
מצב ER	חיובי	99.1%	1,464	98.3%	2,199	98.6%	3,663
	לא ידוע	0.0%	0	0.2%	5	0.1%	5
	G1	18.3%	271	20.8%	468	19.9%	739
שלב	G2	77.9%	1,152	73.9%	1,659	75.7%	2,811
	GX	3.7%	55	4.9%	109	4.4%	164
	N0	70.8%	1,047	76.7%	1,723	74.6%	2,770
מצב הקשריות	N+(1-3)	25.8%	382	20.0%	449	22.4%	831
	N+(≥ 4)	3.3%	49	2.8%	64	3.0%	113
	שלילי	17.6%	260	18.9%	424	18.4%	684
מצב PgR	חיובי	82.4%	1,218	80.4%	1,805	81.4%	3,023
	לא ידוע	0.0%	0	0.3%	7	0.2%	7
	T1	70.2%	1,037	77.7%	1,745	74.9%	2,782
שלב הגידול	T2	28.9%	427	21.0%	472	24.2%	899
	T3	0.9%	14	0.8%	19	0.9%	33
גיל	חציון	63		לא רלוונטי		64	
	טווח	79-41				80-41	

* כולל מטופלת אחת עם < 9 קשריות נגועות

טבלה 31: מאפיינים קליניים נוספים

מאפיין	ערך	מספר מטופלות	אחוז מטופלות
תת-סוג פנימי	LuminalA	1,004	67.9%
	LuminalB	418	28.3%
	HER2-Enriched	48	3.2%
	BasalLike	8	0.5%
סוגי הישנות	מרוחקת	155	10.5%
	כל הישנות	194	13.1%
מצב HER2	שלילי	1,397	94.5%
	חיובי	77	5.2%
	לא ידוע	4	0.3%

תוצאות

מתוך 1,620 הרקמות שהיו זמינות לבדיקה, 25 (1.5%) לא עברו את ההערכה הפתולוגית שהוגדרה מראש לגידול שמתאים להיכליל במחקר, 73 מתוך 1,595 דגימות הרקמה (4.6%) עם רקמה פולשנית חיה לא עברו את מפרטי ה-QC שהוגדרו מראש למיצוי ה-RNA, ו-44 מתוך 1,522 דגימות RNA (2.9%) לא עברו את מפרטי ה-QC של הבדיקה לתוצאות Prosigna, כלומר - לביצוע הניתוח היו 1,478 (91.2%) רקמות זמינות.

מתוך 1,478 מטופלות שהיו זמינות לניתוח, 155 חוו הישנות מרוחקת ו-194 חוו הישנות מקומית או מרוחקת, או מוות, כתוצאה מסרטן השד. מעקב החציון של הניסוי ארך 10 שנים.

הבדיקות של הניתוח הראשי הראו כי דירוג ה-ROR מספק מידע פרוגנוסטי נוסף מובהק עבור שיעור ההישרדות ללא הישנות מרוחקת הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים (CTS).

טבלה 32: סיכום של בדיקות הניתוח הראשי

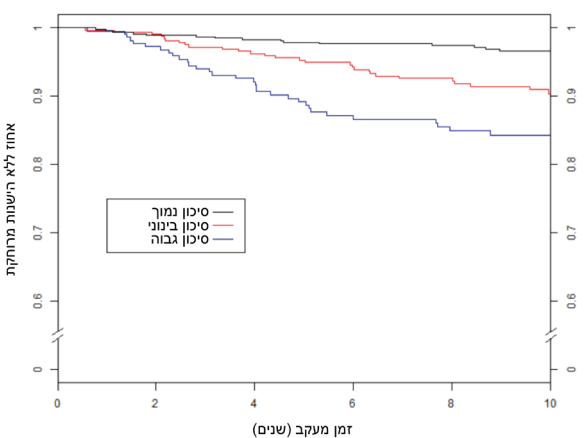
מודל Null	מודל חלופי	$\Delta \text{LR } \chi^2$	ערך קריטי (רמות חופש)	χ^2 ערך-p
CTS	CTS + ROR	53.49	3.84 (df = 1)	p < 0.0001
CTS	CTS + קבוצת סיכון	34.12	5.99 (df = 2)	p < 0.0001

ניתוחי נתונים משניים הראו כי יש קשר מובהק בין ROR לשיעור הישרדות ללא הישנות מרוחקת, וכי הוא מוסיף מידע פרוגנוסטי מעבר ל-CTS בתת-קבוצות רבות בעלות רלוונטיות קלינית.

טבלה 33: חזרה על בדיקות ניתוח ראשי עבור תת-קבוצות מוגדרות מראש

קבוצת נבדקות	מספר מטופלות	מספר אירועים	CTS+ROR מול CTS	CTS+קבוצת סיכון מול CTS
			$\Delta \text{LR } \chi^2$ (ערך קריטי=3.84)	$\Delta \text{LR } \chi^2$ (ערך קריטי=5.99)
הכל	1,478	155	53.49	34.12
HER2-שלילי	1,397	145	47.50	29.94
N0	1,047	86	25.57	23.36
HER2-שלילי, N0	984	79	21.69	20.32
N+(1-3)	382	59	25.99	19.94
N+(1-3), HER2-שלילי	367	56	22.75	18.75

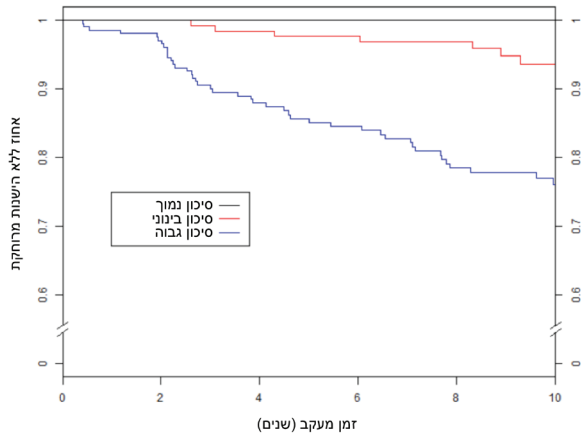
איור 34: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 34 DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	487 (47%)	15	96.6% [97.9% - 94.4%]
בינוני	335 (32%)	28	90.4% [93.3% - 86.3%]
גבוה	225 (21%)	32	84.3% [88.6% - 78.4%]
סה"כ	1,047 (100%)	75	

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



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

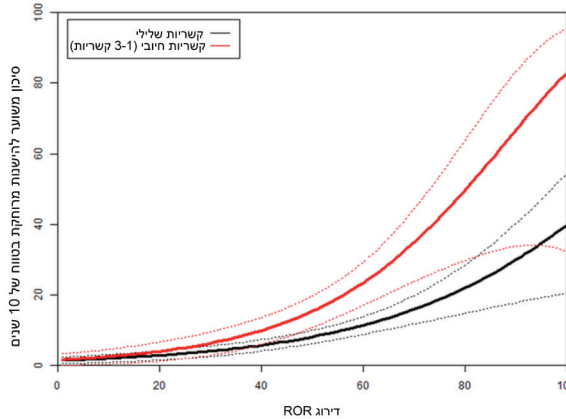
קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	15 (4%)	0	100% [78.2% - 100%]*
בינוני	142 (39%)	7	93.6% [86.8% - 96.9%]
גבוה	210 (57%)	43	76.1% [69.0% - 81.8%]
סה"כ	367 (100%)	50	

* הרווח בר-סמך הוערך בעזרת שיטת Clopper-Pearson.

הקשר בין שיעור ה-ROR וניבוי הסיכון

איור 38 מציג את הסיכון להישנות מרוחקת (DR) בטווח של 10 שנים כפונקציה של דירוג ROR עם רמות ביטחון של 95% בהתבסס על דגמי הסיכונים הפרופורציונליים של קוקס עבור כל קבוצת מטופלות במצב קשריות שלילי ובמצב קשריות חיובי (3-1 קשריות). בקרב מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות), הופרכה הנחת הסיכונים הפרופורציונליים בעת הניסיון לבצע התאמה בכל הטווח. העקומה המוצגת כאן למטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) עשתה שימוש במטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) עם דירוג ROR בטווח של 0-80, שעבורן אומתה הנחת הסיכונים הפרופורציונליים.

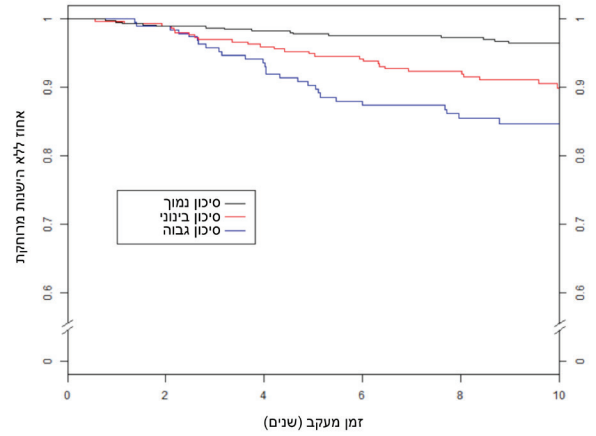
איור 38: הסיכון המשוער להישנות מרוחקת (DR) בטווח של עשר שנים לפי קטגוריית מצב קשריות עם רמות סמך של 95%



בכל תת-קבוצה, הסיכון הקליני האבסולוטי של המטופלות שהוקצו לקטגוריית הסיכון הנמוך, היה שונה באופן מהותי מהסיכון הקליני האבסולוטי של המטופלות שהוקצו לקטגוריית הסיכון הגבוה.

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

איור 35: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי, ו-HER2 שלילי

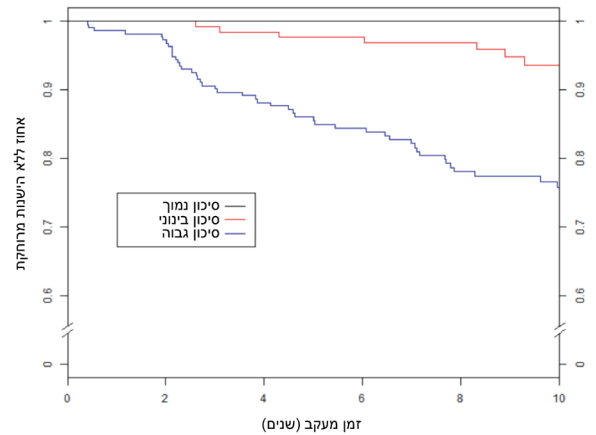


סיכום נתונים עבור איור DRFS 35 לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי, ו-HER2 שלילי

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	474 (48%)	15	96.5% [94.3% - 97.9%]
בינוני	311 (32%)	27	90% [85.6% - 93.1%]
גבוה	199 (20%)	27	84.7% [78.4% - 89.3%]
סה"כ	984 (100%)	69	

איור 36 מציג את אומדי Kaplan-Meier (KM) ואומדי ההיארעות לפי קבוצת סיכון עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי ואיור 37 מציג את אותם נתונים עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי, עם 3-1 קשריות גזעיות. התוצאות עם וולא המטופלות בעלות ה-HER2 החיובי זהות.

איור 36: DRFS לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכום נתונים עבור איור DRFS 36 לפי קבוצת סיכון בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)

קבוצת סיכון	מספר מטופלות (%)	מספר אירועים לאורך 10 שנים	אחוז משוער ללא הישנות מרוחקת בטווח של 10 שנים [95% CI]
נמוך	15 (4%)	0	100% [78.2% - 100%]*
בינוני	143 (37%)	7	93.6% [86.9% - 97%]
גבוה	224 (59%)	46	75.8% [68.9% - 81.4%]
סה"כ	382 (100%)	53	

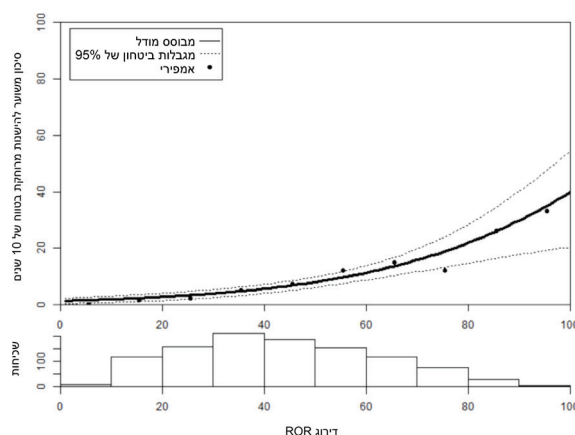
* הרווח בר-סמך הוערך בעזרת שיטת Clopper-Pearson.

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

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

איור 39 מציג את העקומה מבוססת המודל עבור מטופלות עם מצב קשריות שלילי במקביל לשיעורי ההישרדות המשוערים אמפירית בטווח של 10 שנים עבור 10 קבוצות הנתונים (bins), כאשר כל קבוצת נתונים מכילה את כל המטופלות בטווחים של 10 יחידות ROR (10-1, 20-11 וכו'). מתחת לעקומה מופיעה היסטוגרמה המציגה את התפלגות השייכות לפי קבוצת נתונים (bin).

איור 39: השוואה של אומדנים מבוססי מודל ואומדנים אמפיריים של סיכון ל-DR בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי עם התפלגות של דירוגי ROR מוצגת למטה



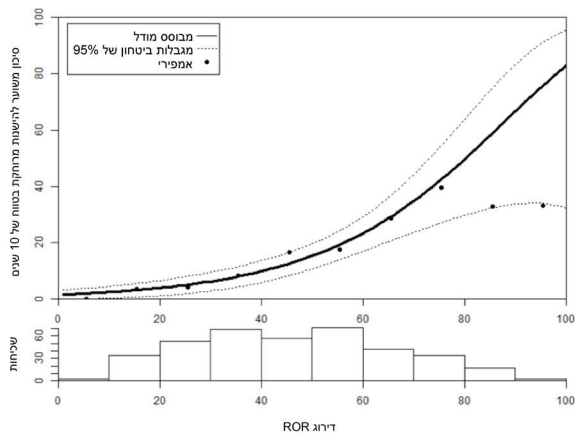
בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי נמצא כי האומדנים מבוססי מודל הסיכונים הפרופורציונליים היו דומים לאומדנים האמפיריים בכל הטווח. טבלה 35 מציגה את ההתפלגות של מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) לפי קבוצות נתונים (bins) של 10 יחידות ROR. גם סיכון ה-DR בטווח של 10 שנים מופיע.

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

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

איור 40 מציג את העקומה מבוססת המודל (שימוש במטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) ודירוגי ROR ≥ 80) עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) במקביל לשיעורי ההישרדות המשוערים אמפירית בטווח של 10 שנים עבור 10 קבוצות הנתונים (bins), כאשר כל קבוצת נתונים מכילה את כל המטופלות בטווחים של 10 יחידות ROR (10-1, 20-11 וכו'). מתחת לעקומה מופיעה היסטוגרמה המציגה את התפלגות השייכות לפי קבוצת נתונים (bin).

איור 40: השוואה של אומדנים מבוססי מודל ואומדנים אמפיריים של סיכון ל-DR בטווח של עשר שנים בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) עם התפלגות של דירוגי ROR מוצגת למטה



טבלה 35 ואיור 40 מציגים שניהם את השתטחות העקומה של הסיכון הנצפה בטווח של עשר שנים בגבול העליון של ה-ROR, עובדה המעידה על הפרדה של הנתח הסיכונים הפרופורציונליים. עם זאת, יש לציין כי גודלי הדגימה בשתי קבוצות הנתונים מעל ל-80 היו שניהם קטנים בקרב מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות) (17 מטופלות בטווח שבין 90-81 ורק 3 בטווח שבין 100-91).

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

מרבית הנבדקות במחקר (96%) היו בעלות תת-הסוג Luminal A או Luminal B - עובדה צפויה בהתחשב בכך שתת-הסוגים הפנימיים הללו דומיננטים בקרב מטופלות בעלות גידולי קולטן הורמון חיובי¹².

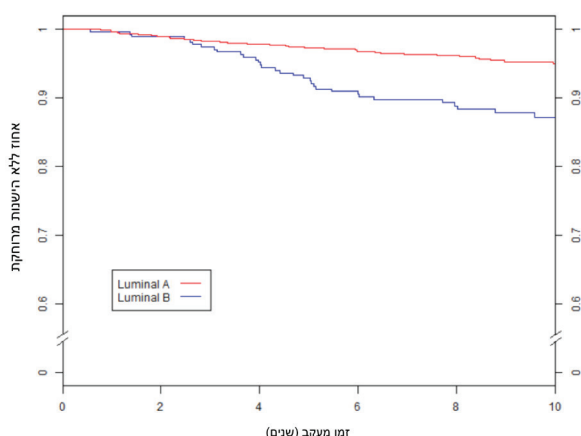
טבלה 36 מציגה את התוצאות של בדיקת יחס הניראות כדי להציג את הערך הפרוגנוסטי הנוסף לשיעור DRFS שמוסיפה ההבחנה בין תת-הסוגים Luminal A/Luminal B מעבר ל-CTS. הטבלה מציגה גם את יחס הסיכון בהשוואה בין מטופלות עם Luminal A למטופלות עם Luminal B. בקרב מטופלות עם Luminal A נצפה שיעור נמוך באופן מובהק להישנות מרוחקת בכל שלוש הקבוצות.

טבלה 36. בדיקת יחס הניראות עבור ערך פרוגנוסטי לשיעור DRFS של תת-הסוגים הלומינליים

תת-קבוצה	# מטופלות	# אירועים	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 ערך-p	יחס סיכון עבור LumA : LumB (95% CI)
הכל	1,422	135	24.42	> 0.0001	0.42 (0.30 - 0.59)
N0	1,009	74	9.68	0.0019	0.47 (0.30 - 0.75)
(3-1)+N	366	51	14.94	0.0001	0.33 (0.19 - 0.58)

איור 41 מציג השוואה של שיעור ה-DRFS לפי תת-סוג לומינלי בקרב מטופלות עם מצב קשריות שלילי. איור 42 מציג את אותה השוואה עבור מטופלות עם מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות). בשתי הקבוצות התגלו הבדלים מובהקים בין שיעור ה-DRFS בקרב מטופלות עם תת-הסוג Luminal A ו-Luminal B.

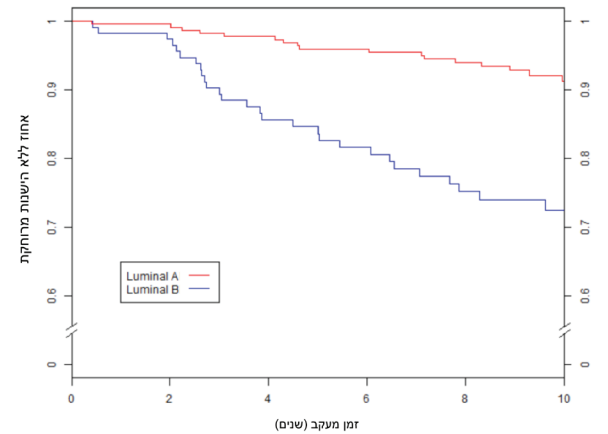
איור 41: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי



סיכום נתונים עבור איור 41 עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי

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

איור 42: עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)



סיכום נתונים עבור איור 42 עקומות Kaplan-Meier (KM) לשיעור DRFS לפי תת-סוג פנימי עבור מטופלות בעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות)

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

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

טבלה 37: שיעורי RFS בטווח של עשר שנים לפי קבוצת קשריות ותת-סוג לומינלי

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

עבור כל אחת מהאוכלוסיות של המטופלות בעלות מצב קשריות שלילי ובעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות), ההבדל בין מטופלות Luminal A ו-Luminal B היה מובהק.

מסקנות של מחקר קליני 2

הוכח כי ה-ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק הרבה מעבר למשתנים הקליניים והטיפולים הסטנדרטיים, הן כשהוא נכלל כמדד רצוף והן כשהוא נכלל בעזרת שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. קבוצת הסיכון הנמוך גילתה שיעור DRFS בטווח של 10 שנים גבוה בהרבה מ-90%, כצפוי. קבוצת הסיכון הגבוה גילתה שיעור DRFS בטווח של 10 שנים של 80%, אשר היה גבוה מן הצפוי—הצפי היה שיעור הרבה יותר נמוך מ-80%. ערכי הסף (cutoffs) אשר שימשו את המחקר להגדרת קבוצות הסיכון היו מבוססים על הקוהורט של TransATAC, המהווה סיכון גבוה יותר מאשר הקוהורט הנוכחי, עובדה המובילה ל"קבוצת סיכון גבוה" בעלת סיכון כולל נמוך יותר מן הצפוי. שיעור ה-ROR (עקבי ומבוסס קבוצת סיכון) גילה מידע פרוגנוסטי דומה בתת-קבוצות שונות. מודל הסיכון הרצוף מתאים מאוד לשיעורי ההישנות האמפיריים בקרב אוכלוסיות של מטופלות בעלות מצב קשריות שלילי ובעלות מצב קשריות חיובי (3-1 קשריות). לרוב המטופלות (96%) במחקר היו גידולים שהשתייכו לאחד משני תת-הסוגים הלומינליים (Luminal A או Luminal B). בכל הקבוצות של מצב הקשריות, ההבחנה בין Luminal A/Luminal B הוסיפה מידע פרוגנוסטי בנוגע לשיעור ה-DRFS.

סיכום של שילוב המחקרים הקליניים

ניתן להכליל את התוצאות ולהפיץ אותן לשימוש נרחב מאחר שהדגימות נשלחו למעבדות שונות ונותחו במעבדות שונות בשני מחקרי התיקוף הקליניים. הוכח כי ה-ROR מוסיף מידע פרוגנוסטי מובהק לשיעור DRFS בטווח של 10 שנים, הרבה מעבר למשתנים הקליניים והטיפולים הסטנדרטיים, הן כשהוא נכלל כמדד רצוף והן כשהוא נכלל בעזרת שלוש קבוצות סיכון מוגדרות מראש. כמו כן, באנליזת פוסט-הוק, ה-ROR הוסיף מידע מובהק לשיעור DRFS אחרי 5 שנים הרבה מעבר למשתנים הקליניים הסטנדרטיים עבור כל המטופלות. שיעור ה-ROR (עקבי ומבוסס קבוצת סיכון) גילה מידע פרוגנוסטי דומה בתת-קבוצות שונות. בוצעו גם אנליזות מוגבלות בעזרת RFS. קבוצות ה-ROR הצליחו גם להגדיר שלוש קבוצות סיכון עם RFS נפרד. בשני המחקרים התגלו הבדלים מובהקים בין שיעור ה-DRFS בקבוצות בעלות תת-הסוג Luminal A ו-Luminal B, ללא קשר למצב הקשריות.

17 ביבליוגרפיה

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008 26:317-325.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009 27(8):1160-1167.
- Dowsett M, et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. J Clinical Oncology. 2013 31(22):2783-2790.
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Cancer Research 2010 70(16):5232-5242.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 2009 4:458-471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium (ERCC) RNA Spike-in Controls. Nature Methods 2010; 2: 731-734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance—of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—24th ed. (CLSI). 2006.
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. JCO. 2014; 32(20):2168-2174.
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010 11(12):1135-1141.
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012 30(7):722-728.
- Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010 28(18):1829-1834.
- Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 2011 29(29):4273-4278.

19 פרטים ליצירת קשר

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



נציג מורשה באיחוד האירופי:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

בעל רשום: איי. אל אמרגו ישראל בע"מ, רח' אנדרה סחרוב 9,
מת"ם, ת.ד. 15054, חיפה, 3190501
טלפון: 02-6731634
מספר רישום אמ"ר:

פרטים גלובליים ליצירת קשר:
תמיכה טכנית דוא"ל: DxSupport@Veracyte.com
דוא"ל פרטי מוצר: info@prosigna.com
אתר אינטרנט: www.prosigna.com

13. 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: של הניסוי 8 ABCSG trial והניסוי ARNO 95. כתב העת Lancet; 2005; 366(9484): 455-462.

(ב) Jonat W, Gnant M, Boccad 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. כתב העת Lancet Oncology; 2006; 991-996; 7(12).

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

18 סמלים והגדרות



- יצרן



- נציג מורשה בקהילה האירופית



- מכשיר רפואי דיאגנוסטי מסוג *in vitro* (נערך במעבדה)



- עיין בהוראות השימוש



- סימן CE



- קוד אצווה / מספר מנה



- מספר קטלוג או סימוכין



- מכיל כמות מספקת ל- >ח בדיקות



- תנאי אחסון טווח טמפרטורות



- תנאי אחסון גבול תחתון של טמפרטורה



- תנאי אחסון גבול עליון של טמפרטורה



- לשימוש עד / תאריך תפוגה



- הצד הזה כלפי מעלה

Room Temp. = טמפרטורת החדר
HYB = היברידיזציה (הכלאה)

כתב ויתור רגולטורי

לשימוש באבחון מסוג *in vitro* (נערך במעבדה).

© VERACYTE, INC 2023. ושותפיה. כל הזכויות שמורות. VERACYTE, הילוגו של VERACYTE, PROSIGNA והילוגו של PROSIGNA הם סימנים מסחריים של VERACYTE, INC. ושל החברות המסונפות לה. NCOUNTER הוא סימן מסחרי של NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC. ובשימוש תחת רישיון.