

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Instrucciones de uso

IVD CE

Declaraciones sobre marcas comerciales, patentes y derechos de propiedad intelectual

Cepheid[®], el logotipo de Cepheid, GeneXpert[®] y Xpert[®] son marcas comerciales de Cepheid, registradas en los EE. UU. y otros países.

Las restantes marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO OTORGA AL COMPRADOR EL DERECHO INTRANSFERIBLE DE UTILIZARLO SEGÚN ESTAS INSTRUCCIONES DE USO. NO SE OTORGA NINGÚN OTRO DERECHO DE FORMA EXPRESA, IMPLÍCITA O POR IMPEDIMENTO LEGAL. LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO TAMPOCO OTORGA NINGÚN DERECHO DE REVENTA.

© 2017-2023 Cepheid.

Consulte el Historial de revisiones para obtener una descripción de los cambios.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

1 Nombre patentado

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Denominación común o habitual

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Indicaciones

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 es un ensayo semicuantitativo basado en la reacción en cadena de la polimerasa con valores de corte cualitativos para ARNm de receptor de estrógenos (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*ERBB2/HER2*) y marcador de proliferación Ki-67 (*MKi67*) aislados de tejido de cáncer de mama invasivo fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). El ARN se extrae de una zona enriquecida de tumor de una sección de tejido microscópica identificada por un anatomopatólogo. La prueba se debe usar en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio para clasificar los tejidos de cáncer de mama en relación con el estado del receptor hormonal, el estado del receptor HER2 y el estado del marcador de proliferación. La prueba está concebida para utilizarse con el sistema GeneXpert[®] e incluye aislamiento de ARN a partir de tejido FFPE, así como la amplificación y detección de secuencias diana dentro del cartucho.

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 no está concebida como:

- Predictor de la gravedad de la enfermedad
- Dispositivo autónomo para pruebas diagnósticas de cáncer de mama
- Un pronosticador de recaídas de la enfermedad

Instrucciones de uso: La prueba se ha concebido para su uso en la evaluación de niveles de ARNm de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67* en tejidos con cáncer de mama invasivo obtenidos de pacientes y preparados como muestras FFPE, y como ayuda en la evaluación clínica junto con otros datos de laboratorio.

4 Resumen y explicación

El cáncer de mama es uno de los cánceres más frecuente entre mujeres de todo el mundo, con aproximadamente 1,7 millones de casos nuevos de cáncer de mama al año.¹ En Europa, cada año se diagnostican aproximadamente 494 000 nuevos casos y 143 000 pacientes morirán de su enfermedad. En los EE.UU., se diagnosticaron aproximadamente 200 000 casos nuevos de cáncer de mama invasivo en el 2015.² El cáncer de mama es la causa más frecuente de mortalidad por cáncer entre las mujeres de los países en vías de desarrollo, y la segunda causa más frecuente de mortalidad por cáncer (después del cáncer de pulmón) entre las mujeres de los países desarrollados.²

En las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer.¹ La mortalidad por cáncer de mama se ha reducido en un 34% desde 1990 en gran medida debido a la mejora del tratamiento y a la detección precoz.³ Las medidas de la expresión de las proteínas ER y PR son factores pronóstico para los resultados del cáncer de mama y predicen la respuesta a tamoxifeno y a otras terapias hormonales.^{4,5,6,7} La sobreexpresión de HER2 indica un pronóstico adverso en mujeres con cáncer de mama; pero lo más importante la respuesta a trastuzumab u a otras terapias dirigidas a HER2 está prevista por la sobreexpresión de la proteína HER2 (*ERBB2*) o la amplificación genética de HER2.⁸ El marcador de proliferación Ki-67 (*MKi67*) se ha estudiado ampliamente en estudios retrospectivos

que implicaban pacientes con cáncer de mama⁹ y se considera un indicador importante de la necesidad de quimioterapia.¹⁰ Los metaanálisis han demostrado que está relacionado con peores resultados de supervivencia en la fase inicial del cáncer de mama.¹¹ Dada la importancia de estos marcadores en la selección de una pauta de tratamiento eficaz para un paciente con cáncer de mama, las directivas de tratamiento de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) recomiendan que todos los carcinomas de mama primarios sean analizados en cuanto a ER, PR, HER2 (ERBB2) y Ki67 en el momento del diagnóstico.¹²

Las pruebas inmunohistoquímicas (IHC) suelen utilizarse para la medición de la expresión de las proteínas ER, PR, HER2 y Ki67. Para la expresión de HER2, IHC es normalmente la primera prueba realizada y los resultados se informan en una escala de 0 a 3+. Si el resultado es equivoco para la expresión HER2 (2+), la muestra se refleja en un ensayo de hibridación (ISH) in situ de HER2, tal como la hibridación fluorescente in situ (FISH) o hibridación cromogénica in situ (CISH) que busca la amplificación genética de HER2.¹³ Se ha demostrado un alto grado de variabilidad en los resultados para IHC e ISH cuando se comparan entre los laboratorios, en gran medida debido a las diferencias en los anticuerpos usados para IHC, así como a la subjetividad en los métodos de interpretación.¹⁴

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 es una prueba de diagnóstico in vitro usado para la determinación de los niveles de expresión de ARNm de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67* aislado de muestras FFPE de tejido de cáncer de mama invasivo.

El ensayo se realiza en un cartucho autónomo siguiendo un breve paso de preparación de lisado de la muestra externo, que requiere menos de 15 minutos de manipulación con un tiempo de obtención de resultados total de menos de 2 horas.

5 Principio del procedimiento

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 es un ensayo en tiempo real basado en la reacción en cadena de la polimerasa con (PCR) para la detección de ARNm de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67* aislado a partir de tejido de mama invasivo fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). El ensayo se realiza en los sistemas GeneXpert de Cepheid. Los sistemas GeneXpert automatizan e integran la purificación de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de secuencias diana en muestras simples o complejas mediante RT-PCR en tiempo real. Los sistemas constan de un instrumento, un lector de códigos de barras, un ordenador y software precargado para realizar las pruebas y ver los resultados. Los sistemas emplean cartuchos GeneXpert desechables, de un solo uso, que contienen los reactivos de RT-PCR y alojan el proceso de RT-PCR. Para ver una descripción completa de los sistemas, consulte el Manual del operador del sistema GeneXpert correspondiente.

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 incluye reactivos para la detección simultánea de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, un gen de referencia de proteína de interacción con *FMR1* citoplasmático 1 (*CYFIP1*), un control de RT-PCR interno (*CIC*) y un control de comprobación de la sonda interno (*PCC*). El gen de referencia verifica la adecuación de la muestra y se utiliza para normalizar los niveles de expresión de ARNm de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67*. El control de RT-PCR interno (*CIC*) se utiliza para verificar que la reacción de RT-PCR se produjo correctamente. El *PCC* verifica la rehidratación de la microesfera de reactivo, el llenado del tubo de RT-PCR, la integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes en el cartucho. En total, el ensayo utiliza seis canales fluorescentes diferenciados para la detección de dianas o controles/referencias con sus propios parámetros de corte para la validez de las dianas, los controles y las referencias.

Las muestras FFPE deben tratarse primero con el Xpert® FFPE Lysis Kit preparando una sección de tejido de 4-5 µm (micrómetros) donde el tejido FFPE se macrodiseca primero, si es necesario, para enriquecer el área del tumor invasivo, y, a continuación, se raspa y se coloca en un tubo junto con los volúmenes recomendados de reactivo de lisis FFPE y proteína K. Luego se incuba la solución en un bloque de calor a 80 °C durante 30 minutos. A continuación se mezcla etanol con la muestra y, entonces, se añade directamente a un cartucho de prueba el volumen recomendado del lisado de muestra preparado. El cartucho de prueba se inserta en un módulo de un sistema GeneXpert donde el sistema lleva a cabo la purificación, la amplificación y la detección en tiempo real de los ácidos nucleicos de manera totalmente automatizada e integrada. Todos los reactivos requeridos para la preparación de muestras en el instrumento y el análisis por RT-PCR están precargados en el cartucho. Los ácidos nucleicos del lisado se capturan sobre un filtro, se lavan y se eluyen mediante ultrasonidos. El ácido nucleico purificado se mezcla con los reactivos de RT-PCR secos, y la solución se transfiere al tubo de reacción para la RT-PCR y la detección. El resultado se obtiene en unos 75 minutos en el GeneXpert.

Los valores de corte de detección que utiliza la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 en cada canal fluorescente se establecieron para obtener el máximo porcentaje de concordancia en positivos, negativos y global en la comparación con las pruebas IHC o IHC/FISH de laboratorios de referencia para cada diana. Las pruebas IHC de ER, PR, Ki67 y HER2, así como las pruebas FISH de HER2 se procesaron y puntuaron siguiendo el contenido de las instrucciones de uso. La interpretación de los resultados se hizo conforme a las pautas de ASCO/CAP de 2013.¹⁵ Los tumores se clasificaron como positivos en ER o en PR/IHC cuando el 1 % o más de las células de los tumores invasivos mostraron una tinción nuclear definida, independientemente de la intensidad de la tinción. La expresión de HER2 se evaluó con el kit HercepTest (IHC) (Dako) y se puntuó como 0, 1+, 2+ o 3+. Los tumores puntuados con un 2+ fueron sometidos a la prueba FISH de HER2 utilizando el kit de sonda de ADN de HER2 PathVysion (Vysis-Abbott, Chicago, IL, EE. UU.). Los casos se consideraron positivos en HER2 si puntuaron 3+ según las pruebas IHC y/o amplificados mediante FISH (definidos como una proporción HER2:CEP17 \geq 2,0), y/u obtuvieron un número promedio de copias de HER2 \geq 6,0 señales/célula según la

actualización de las pautas de prácticas clínicas de ASCO/CAP para las pruebas de HER2 en cáncer de mama de 2013.¹⁵ Para Ki67, los tumores se clasificaron como positivos (alto) cuando ≥ 20 % de las células tumorales invasivas mostró una tinción nuclear definida, independientemente de la intensidad de la tinción.

En el caso del control de gen de referencia y del control de RT-PCR interno, los valores de corte de detección definen intervalos de valores PCR umbrales (Ct) de ciclo mínimos y máximos que determinan un resultado válido, una entrada mínima de muestra adecuada y ausencia de inhibición de la PCR. En el caso de las dianas de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67, los valores de corte de detección están definidos por los valores del umbral de ciclo delta (dCt) (Ct del gen de referencia menos Ct del gen diana) que determinan resultados «POSITIVOS (POSITIVE)» frente a «NEGATIVOS (NEGATIVE)» para una diana dada en un canal.

6 Reactivos e instrumentos

6.1 Material suministrado

El kit del Xpert Breast Cancer STRAT4 contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de control de calidad o lisados FFPE preparados con el Xpert FFPE Lysis Kit (nº de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). El kit del Xpert Breast Cancer STRAT4 contiene los siguientes elementos:

Cartuchos del Xpert Breast Cancer STRAT4 con tubos de reacción integrados	10
<ul style="list-style-type: none"> • Microesfera 1, 2 y 3 (liofilizada) • Reactivo de enjuague, • Reactivo de elución, 	<ul style="list-style-type: none"> 1 por cartucho 1,0 ml por cartucho 2,0 ml por cartucho
CD	1 por kit
<ul style="list-style-type: none"> • Archivo de definición del ensayo (ADF) • Instrucciones de uso • Archivos de informe ONCore 	

Nota Las fichas de datos de seguridad (FDS) están disponibles en el apartado **ASISTENCIA (SUPPORT)** de www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com.

Nota La albúmina sérica bovina (BSA) del interior de las microesferas de este producto se obtuvo y se fabricó exclusivamente a partir de plasma bovino originario de Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados con proteínas de rumiantes ni con otras proteínas animales; los animales superaron las pruebas ante y post mortem. Durante el procesamiento, no hubo mezcla del material con otros materiales de origen animal.

7 Conservación y manipulación

- Conserve el contenido del kit del Xpert Breast Cancer STRAT4 a 2-28 °C.
- No abra la tapa del cartucho hasta el momento de realizar la prueba.
- Utilice el cartucho antes de que transcurran 30 minutos después de abrir la tapa.
- No utilice cartuchos que presenten fugas.

8 Materiales requeridos pero no suministrados

- Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10) para preparar el lisado FFPE. Este kit consta de reactivo de lisis FFPE, proteinasa K (PK), tubos de 1,5 ml y frascos de 5 ml.
- Agitadora vorticial.
- Pipetas y puntas de pipeta con filtro de aerosol adecuadas para pipetear 600 µl, 1,2 µl y 520 µl.
- Ordenador con software GeneXpert patentado versión 4.7b o superior, o Xpertise versión 6.4b o superior, lector de códigos de barras y manual del operador del sistema GeneXpert correspondiente.
- Impresora: Si se requiere una impresora, póngase en contacto con el servicio técnico de Cepheid para organizar la compra de una impresora recomendada.

9 Declaraciones de atención y precaución

- Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras biológicas deberán tratarse como transmisores potenciales de agentes infecciosos. Todas las muestras humanas deberán tratarse con las medidas de precaución habituales. Las directrices para la manipulación de muestras pueden obtenerse a través de la Organización Mundial de la Salud o de los Centros para el control y la prevención de enfermedades de Estados Unidos.
- Siga los procedimientos de seguridad de su centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- La eficacia diagnóstica de esta prueba se ha determinado con el tipo de muestra especificado en Apartado 3. No se ha evaluado el rendimiento de este ensayo con otras muestras o tipos de muestra.
- El tejido FFPE debe procesarse con el Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- La extracción incompleta (raspado) del área del tumor del portaobjetos para la preparación del lisado FFPE podría dar lugar a material insuficiente para el ensayo y, por consiguiente, a una tasa de resultados indeterminados/no válidos mayor de lo previsto con la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4.
- No abra la tapa del cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4 excepto cuando vaya a añadir lisado FFPE preparado.
- No utilice cartuchos que se hayan caído después de extraerlos del empaquetado.
- No agite el cartucho. Si el cartucho se agita o se deja caer después de haber abierto su tapa, es posible que se obtengan resultados no válidos.
- No utilice un cartucho que tenga un tubo de reacción dañado.
- Cada cartucho de un solo uso del Xpert Breast Cancer STRAT4 se utiliza para procesar una sola prueba. No vuelva a utilizar los cartuchos usados.
- No utilice cartuchos que parezcan mojados o que tengan el precinto de la Tapa roto.
- No coloque la etiqueta de ID de la muestra en la tapa del cartucho ni sobre la etiqueta del código de barras.
- Para evitar la contaminación de las muestras o los reactivos, se recomienda seguir las buenas prácticas de laboratorio, lo que incluye el cambio de guantes entre las manipulaciones de muestras de pacientes.
- Consulte con el personal de residuos medioambientales de su centro el procedimiento correcto de eliminación de cartuchos utilizados y de reactivos sin utilizar. Compruebe la normativa regional, comunitaria y local, ya que podría diferir de la normativa nacional de eliminación. El material puede presentar características de residuos peligrosos y necesitar requisitos de eliminación específicos. Los centros deben consultar sus requisitos de eliminación de residuos peligrosos.

10 Peligros químicos^{16,17}

De acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), este material no se considera peligroso.

11 Recogida, transporte y conservación de las muestras

- Utilice únicamente con muestras FFPE procesadas con el Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). Siga las pautas de ASCO/CAP¹⁵ para preparar tejido FFPE.
- El lisado de FFPE deberá prepararse a partir de un bloque de tumor FFPE con la mayor área de carcinoma de mama viable (un mínimo de 30 % de celularidad tumoral), y la macrodissección manual deberá realizarse, si es necesaria, antes del análisis con la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4. En el caso de las muestras tumorales de menos de 10 mm² con menos de 30 % de tumor, puede ser necesario utilizar el procedimiento de lisado concentrado o más de una sección de 4-5 µm para obtener resultados válidos.
- El lisado FFPE deberá transportarse al laboratorio a 2-8 °C.
- El lisado FFPE es estable durante un máximo de 1 semana a 2-8 °C o 4 semanas a una temperatura de -20 °C o inferior antes de llevar a cabo los análisis con el Xpert Breast Cancer STRAT4. Para la conservación a largo plazo, conserve el producto a -80 °C. No se recomienda congelar y descongelar el producto más de una vez. Cuando se descongele, descongele a temperatura ambiente y agite con vórtex el lisado FFPE durante 15 segundos antes del uso.

12 Procedimiento

Importante El uso del cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4 requiere la preparación de un lisado utilizando el Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Importante Inicie el ensayo en los 30 minutos siguientes a la adición de la muestra preparada al cartucho.

12.1 Preparación del lisado FFPE

Prepare el lisado FFPE siguiendo las instrucciones de uso del FFPE Lysis Kit.

12.2 Preparación del cartucho

1. Saque el cartucho del envase de cartón.
2. Homogeneice el lisado FFPE preparado en una agitadora vorticial 15 segundos antes del uso.
3. Abra la tapa del cartucho.
4. Con una pipeta, transfiera 520 µl de lisado FFPE a la cámara de muestras del cartucho. (Nota: puede haber presente una pequeña cantidad de precipitado, lo que no afectará al rendimiento del ensayo).

Conserve el lisado FFPE restante a 2-8 °C o a una temperatura de -20 °C o inferior para el caso de que haya que repetir la prueba.



Figura 1. Cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4 (vista superior)

5. Cierre la tapa del cartucho. Asegúrese de que la tapa encaje firmemente en su sitio.

12.3 Inicio de la prueba

Importante Antes de iniciar la prueba, asegúrese de que se haya importado al software el archivo de definición del ensayo (ADF) del Xpert Breast Cancer STRAT4.

Este apartado enumera los pasos predeterminados para utilizar el sistema GeneXpert. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* o el *Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity*, según el instrumento que se esté utilizando.

Nota Los pasos que debe seguir pueden variar si el administrador del sistema ha cambiado el flujo de trabajo predeterminado del sistema.

1. Encienda el instrumento GeneXpert:
 - Si está utilizando el instrumento GeneXpert Dx, encienda primero el instrumento GeneXpert Dx y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert se ejecutará automáticamente o puede requerir que se haga doble clic en el icono del software GeneXpert Dx en el escritorio de Windows®.

o

- Si está utilizando el instrumento GeneXpert Infinity, ponga en marcha el instrumento. El software Xpertise se ejecutará automáticamente o puede requerir que se haga doble clic en el icono del software Xpertise en el escritorio de Windows.
2. Inicie sesión en el software del sistema GeneXpert con su nombre de usuario y su contraseña. En la ventana del sistema GeneXpert, haga clic en **Crear prueba (Create Test)** (GeneXpert Dx) o en **Solicitudes (Orders)** y **Solicitar prueba (Order Test)** (Infinity). Se abre la ventana Create prueba (Create Test).
 3. Escanee o escriba la Id. muestra (Sample ID). Si escribe la Id. muestra (Sample ID), asegúrese de escribirla correctamente. La Id. muestra (Sample ID) se asocia a los resultados del ensayo, y se muestra en la ventana Ver resultados (View Results) y en todos los informes. Aparecerá el cuadro de diálogo Escanear cartucho (Scan Cartridge).
 4. Escanee el código de barras del cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4. Aparecerá la ventana Crear prueba (Create Test). El software utiliza la información del código de barras para rellenar automáticamente los cuadros de los campos siguientes: Select Assay (Seleccionar ensayo), Reagent Lot ID (Id. del lote de reactivo) y Cartridge SN (Nº de serie del cartucho).
 5. Haga clic en **Iniciar prueba (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Enviar (Submit)** (Infinity). Introduzca su contraseña si se le solicita.
 6. En el instrumento GeneXpert Dx:
 - a) Abra la puerta del módulo del instrumento que tiene la luz verde intermitente y cargue el cartucho.
 - b) Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
 - c) Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta del módulo antes de abrirla. Retire el cartucho.
 - d) Elimine los cartuchos usados en los recipientes de residuos de muestras adecuados, de acuerdo con las prácticas habituales de su centro. Consulte la Apartado 9.

o

En el sistema GeneXpert Infinity, coloque el cartucho en la cinta transportadora. El cartucho se cargará automáticamente, se realizará la prueba y el cartucho usado se colocará en el recipiente de residuos.

13 Visualización e impresión de los resultados

Este apartado describe los pasos básicos para ver e imprimir los resultados. Para obtener instrucciones más detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* o el *Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity*, según el instrumento utilizado.

1. Haga clic en el icono **Ver los resultados (View Results)** para ver los resultados.
2. Una vez finalizada la prueba, haga clic en el botón **Informe (Report)** de la pantalla Ver resultados (View Results) para ver o generar un archivo de informe en formato PDF.

Nota

Si utiliza el software ONCore para generar un informe, consulte la Guía del usuario del software GeneXpert ONCore en el CD de la Guía del usuario de ONCore para obtener las instrucciones sobre cómo generar un informe. Consulte también las instrucciones del informe ONCore en el CD de Xpert Breast Cancer STRAT4 para ver las instrucciones sobre cómo interpretar el informe ONCore para la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4.

14 Control de calidad

Cada prueba contiene un control de gen de referencia (*CYFIP1*) y un control de comprobación de la sonda (PCC).

- **Control *CYFIP1***: Este gen de referencia se utiliza para normalizar los niveles de expresión de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67*. También sirve como control de adecuación de la muestra (SAC), asegurando que la muestra contiene suficiente ARN. Para que la prueba arroje un resultado válido es necesaria una señal de *CYFIP1* mínima. Una señal de *CYFIP1* por debajo de la cantidad mínima o una señal negativa indican que la muestra no contiene suficiente ARN.
- **Alternativa de *CYFIP1***: Este es un control duplicado de *CYFIP1* utilizado en el algoritmo cuando el umbral del ciclo delta (dCt) de *PGR* o *MKi67* está por debajo del ajuste de los valores de corte del ensayo. Para estas dianas, se necesita una señal alternativa de *CYFIP1* mínima adicional para garantizar un resultado válido de la prueba.
- **Control de comprobación de la sonda (PCC)**: Antes de iniciar la PCR, el sistema GeneXpert mide la señal de fluorescencia de las sondas para monitorizar la rehidratación de las microesferas, el llenado del tubo de reacción, la

integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes. El PCC se considera superado si cumple los criterios de aceptación validados.

- **Controles externos (no suministrados):** Los controles externos deben utilizarse de acuerdo con los requisitos de las organizaciones de acreditación locales, estatales/provinciales y nacionales, según corresponda.

15 Interpretación de los resultados

El sistema GeneXpert interpreta automáticamente los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y de los algoritmos de cálculo incorporados, y los muestra claramente en la ventana Ver resultados (View Results) en las fichas Resultado (Test Results) y Resultado de analito (Analyte Result). En el informe de la prueba también se muestran los datos de Resultado (Test Result) y Resultado de analito (Analyte Result). Los resultados posibles se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1. Todos los resultados posibles para la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4

Resultado mostrado	CYFIP1	Alternativa de CYFIP1	CIC
POSITIVO EN <i>ESR1</i> (<i>ESR1</i> POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
NEGATIVO EN <i>ESR1</i> (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
POSITIVO EN <i>PGR</i> (<i>PGR</i> POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
NEGATIVO EN <i>PGR</i> (<i>PGR</i> NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS	POS o NEG
POSITIVO EN <i>ERBB2</i> (<i>ERBB2</i> POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
NEGATIVO EN <i>ERBB2</i> (<i>ERBB2</i> NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
POSITIVO EN <i>MKi67</i> (<i>MKi67</i> POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
NEGATIVO EN <i>MKi67</i> (<i>MKi67</i> NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS	POS o NEG
INDETERMINADO EN <i>PGR</i> (<i>PGR</i> INDETERMINATE)	SUPERADO (PASS)	NEG	POS o NEG
INDETERMINADO EN <i>MKi67</i> (<i>MKi67</i> INDETERMINATE)	SUPERADO (PASS)	NEG	POS o NEG
REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)	SUPERADO (PASS)	POS o NEG	NEG
NO VÁLIDO (INVALID)	NO SUPERADO (FAIL)	NEG	POS o NEG
ERROR	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)
SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)

Tabla 2. Resultados representativos del Xpert Breast Cancer STRAT4, con sus interpretaciones

Resultado	Interpretación
<p>POSITIVO EN ESR1 (ESR1 POSITIVE)</p> <p>Consulte la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>ESR1</i> está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por encima del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>POSITIVO EN PGR (PGR POSITIVE)</p> <p>Consulte la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>PGR</i> está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por encima del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>POSITIVO EN ERBB2 (ERBB2 POSITIVE)</p> <p>Consulte la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>ERBB2</i> está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por encima del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>POSITIVO EN MKI67 (MKI67 POSITIVE)</p> <p>Consulte la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>MKI67</i> está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por encima del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>NEGATIVO EN ESR1 (ESR1 NEGATIVE)</p> <p>Consulte la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>ESR1</i> no está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por debajo del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>NEGATIVO EN PGR (PGR NEGATIVE)</p> <p>Consulte la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>PGR</i> no está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por debajo del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> – POS; <i>CYFIP1</i> tiene un umbral de ciclo (Ct) dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.

Resultado	Interpretación
<p>NEGATIVO EN ERBB2 (ERBB2 NEGATIVE)</p> <p>Consulte la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>ERBB2</i> no está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por debajo del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>NEGATIVO EN MKi67 (MKi67 NEGATIVE)</p> <p>Consulte la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El transcrito de ARNm de <i>MKi67</i> no está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por debajo del valor de corte configurado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> – POS; <i>CYFIP1</i> tiene un umbral de ciclo (Ct) dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>Indeterminado en PGR (PGR Indeterminate)</p> <p>Consulte la Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El nivel de expresión de ARNm de <i>PGR</i> no puede determinarse debido a que la muestra no contiene suficiente material. Repita la prueba utilizando un lisado más concentrado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> – NEG; el umbral de ciclo (Ct) de <i>CYFIP1</i> no estuvo dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estuvo por debajo del umbral configurado necesario para la determinación del estado de PGR. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>Indeterminado en MKi67 (MKi67 Indeterminate)</p> <p>Consulte la Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El nivel de expresión de ARNm de <i>MKi67</i> no puede determinarse debido a que la muestra no contiene suficiente material. Repita la prueba utilizando un lisado más concentrado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> – NEG; el umbral de ciclo (Ct) de <i>CYFIP1</i> no estuvo dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estuvo por debajo del umbral configurado necesario para la determinación del estado de MKi67. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.

Resultado	Interpretación
<p>REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)</p> <p>Consulte la Figura 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> No se pueden determinar los niveles de expresión de ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Repita la prueba utilizando una alícuota del lisado de muestra FFPE conservado. <i>CYFIP1</i> – SUPERADO (PASS); se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>; su umbral de ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> - POS/NEG; se ha detectado transcrito de ARNm de <i>CYFIP1</i>. El transcrito puede o no tener un umbral de ciclo (Ct) dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral configurado. CIC – NEG; el control interno tiene un umbral de ciclo (Ct) fuera del intervalo válido. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>NO VÁLIDO (INVALID)</p>	<ul style="list-style-type: none"> NO VÁLIDO (INVALID) - los niveles de expresión de ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> no pueden determinarse debido a que la muestra no contiene suficiente material. Repita la prueba utilizando un lisado más concentrado. <i>CYFIP1</i> – NO SUPERADO (FAIL); el umbral de ciclo (Ct) del <i>CYFIP1</i> no estuvo dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estuvo por debajo del umbral configurado. Alternativa de <i>CYFIP1</i> – NEG; el umbral de ciclo (Ct) del <i>CYFIP1</i> no estuvo dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estuvo por debajo del umbral configurado. Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
<p>ERROR</p>	<ul style="list-style-type: none"> No se pueden determinar los niveles de expresión de ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Repita la prueba utilizando una alícuota del lisado de muestra FFPE conservado. <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – SIN RESULTADO (NO RESULT) Alternativa de <i>CYFIP1/CYFIP1</i> – SIN RESULTADO (NO RESULT) Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS)*/NO SUPERADO (FAIL); todos o uno de los resultados de la comprobación de la sonda no superaron la comprobación. <p>* Si se ha superado la comprobación de la sonda, el error se debe a que el límite máximo de presión ha excedido el intervalo aceptable, a un error en el ajuste de la curva o a que ha fallado un componente del sistema.</p>
<p>SIN RESULTADO (NO RESULT)</p>	<ul style="list-style-type: none"> No se pueden determinar los niveles de expresión de ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. No se obtuvieron suficientes datos para producir un resultado de la prueba. Por ejemplo, esto puede ocurrir si el usuario paró una prueba que estaba en curso. Repita la prueba utilizando el lisado de muestra FFPE conservado. <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – SIN RESULTADO (NO RESULT) Alternativa de <i>CYFIP1/CYFIP1</i> – SIN RESULTADO (NO RESULT) Comprobación de la sonda – N/A (NA) (no aplicable)

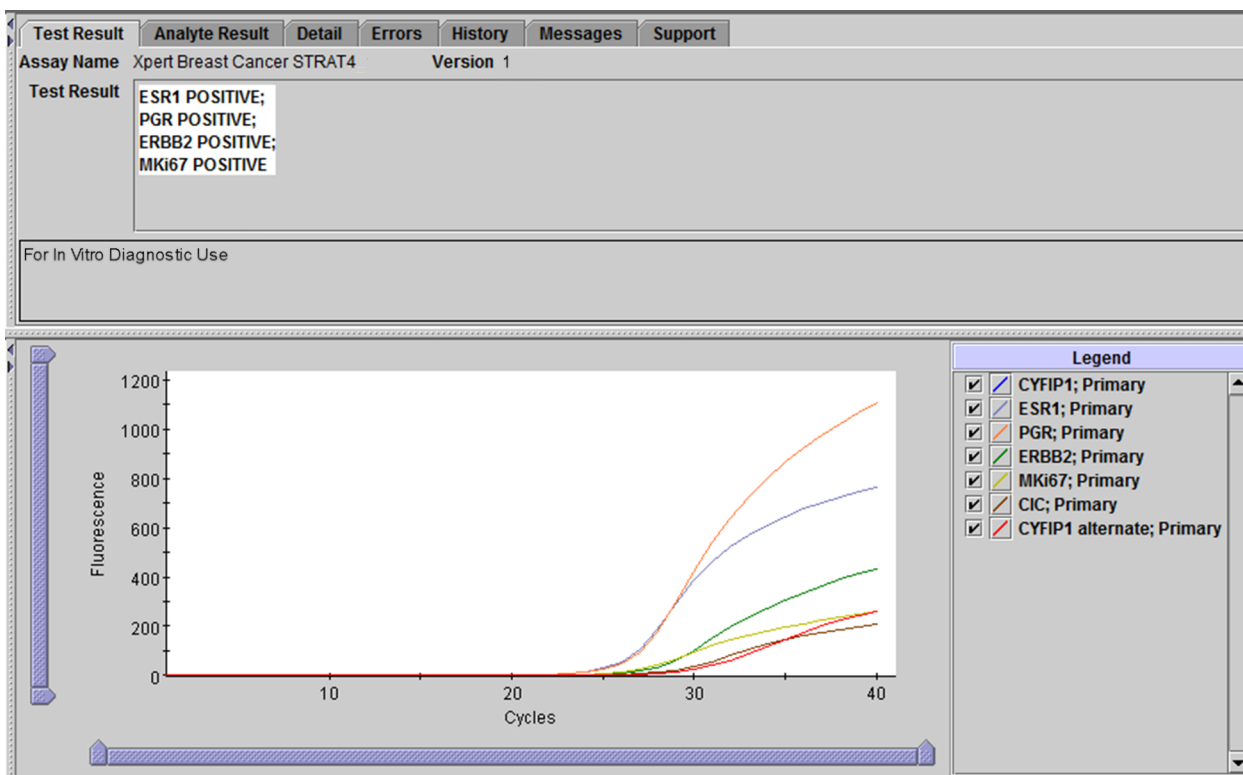


Figura 2. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: POSITIVO EN ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVE)

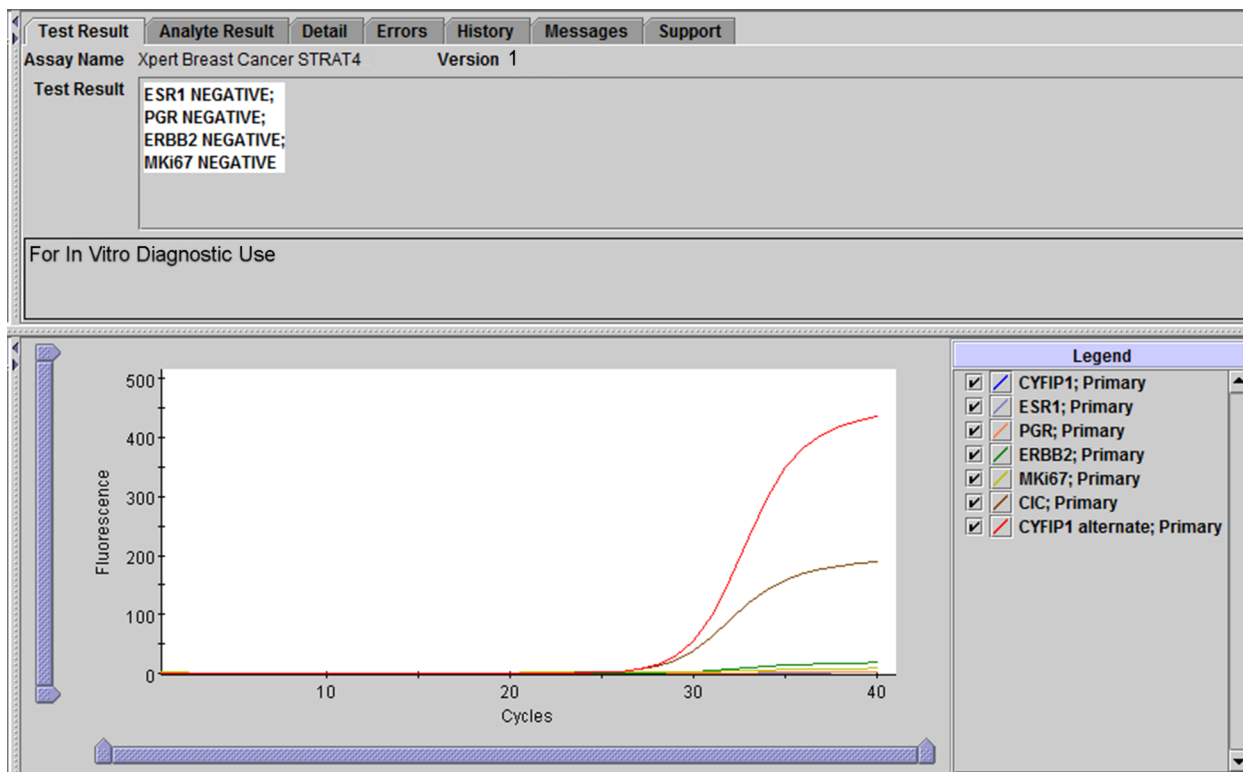


Figura 3. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: NEGATIVO EN ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVE)

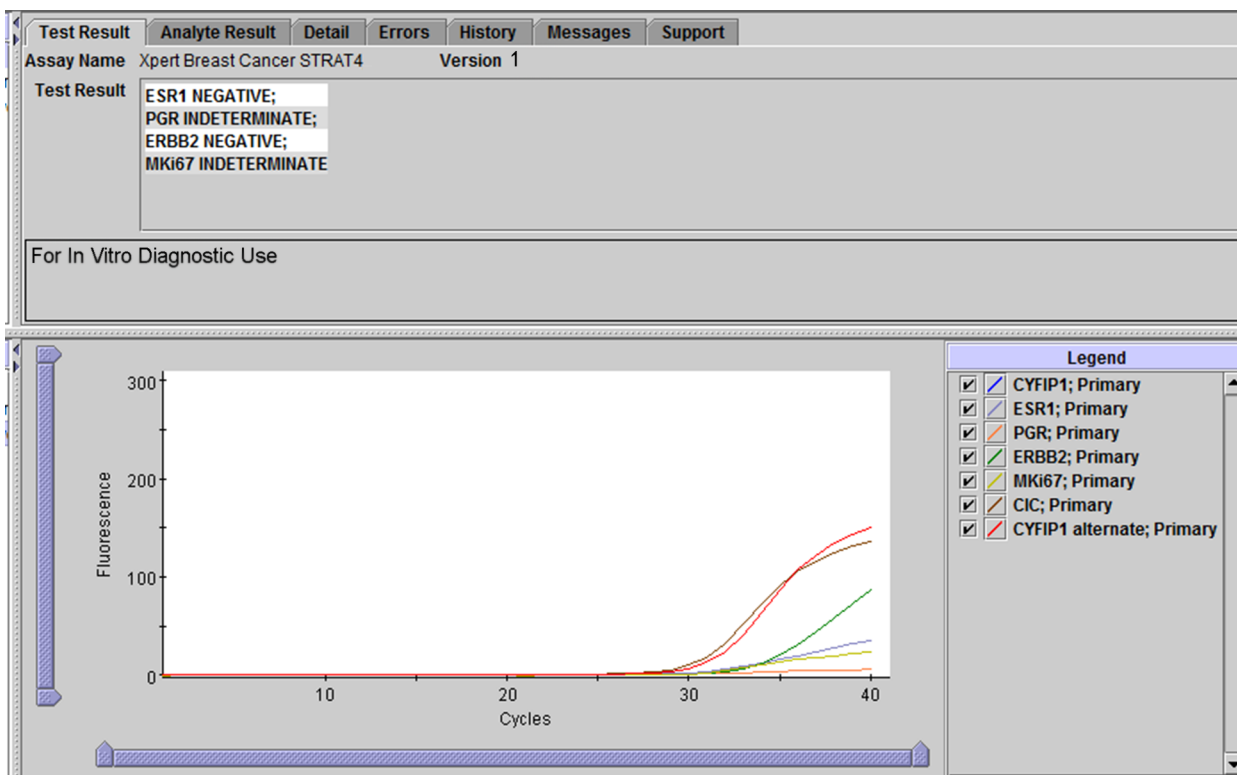


Figura 4. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: INDETERMINADO EN PGR/MKi67 (PGR/MKi67 INDETERMINATE)

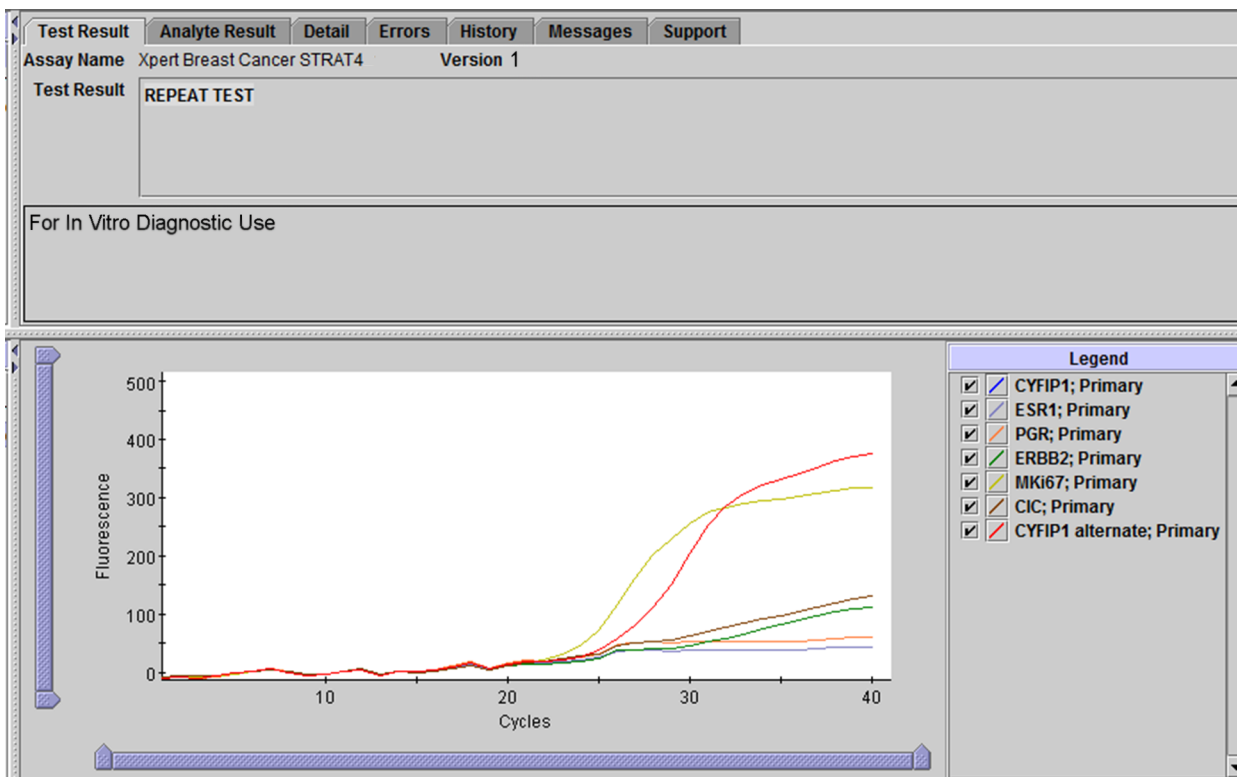


Figura 5. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)

16 Razones para repetir la prueba

Repita la prueba utilizando un cartucho nuevo (no vuelva a utilizar el cartucho).

- Un resultado **REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)** indica que el control interno no superó la comprobación. La muestra no se procesó correctamente. En ese caso, repita la prueba utilizando una nueva alícuota de 520 µl del mismo lisado FFPE.
- Un resultado **NO VÁLIDO (INVALID)** indica que el control de referencia no superó la comprobación. La muestra no se procesó correctamente, la PCR se inhibió o la calidad del ARN del tumor al que se accedió no era la adecuada. En ese caso, repita la prueba con un lisado FFPE más concentrado siguiendo el contenido de las instrucciones de uso del FFPE Lysis Kit.
- Un resultado de **ERROR** indica que el control de comprobación de la sonda no superó la comprobación y que el ensayo se interrumpió, debido posiblemente a que el tubo de reacción no se llenó correctamente, a que se detectó un problema de integridad de la sonda de reactivo, a que se excedieron los límites máximos de presión o a que se detectó un error de posición de una válvula. En ese caso, repita la prueba utilizando una nueva alícuota de 520 µl del mismo lisado FFPE.
- **SIN RESULTADO (NO RESULT)** indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, el operador detuvo una prueba en curso o se produjo un corte del suministro eléctrico. En ese caso, repita la prueba utilizando una nueva alícuota de 520 µl del mismo lisado FFPE.
- Si un CC externo deja de actuar según lo esperado, repita la prueba con el control externo o póngase en contacto con Cepheid para recibir asistencia.

17 Limitaciones

- Las modificaciones de estos procedimientos pueden afectar a la eficacia de la prueba. Los resultados del Xpert Breast Cancer STRAT4 se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.
- El rendimiento del Xpert Breast Cancer STRAT4 se validó mediante los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso con muestras FFPE que tenían entre cinco y diez años.
- El rendimiento del Xpert Breast Cancer STRAT4 se validó únicamente con los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso.
- La prueba puede arrojar resultados erróneos si las muestras no se recogen, manipulan y conservan correctamente, o si se confunden las muestras. El estricto cumplimiento del contenido de estas instrucciones de uso es necesario para evitar resultados erróneos.
- No se ha establecido la eficacia diagnóstica en pacientes menores de 25 años.
- Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de los cebadores o las sondas pueden dar lugar a resultados erróneos pero creíbles para *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* y *MKi67*.

18 Eficacia diagnóstica

18.1 Eficacia clínica

La eficacia diagnóstica de la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 se evaluó comparando sus resultados con los resultados de la prueba IHC de ER, PR, HER2 y Ki67, y con los de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para la amplificación de gen HER2 en centros de EE. UU. y la UE. Inicialmente, este estudio incluyó un total de 211 muestras FFPE de tumores primarios de cáncer de mama invasivo sobrantes desidentificadas de EE. UU. y la UE. 10 muestras se excluyeron debido a que no había suficiente tumor disponible para los ensayos, y una muestra se excluyó por la retirada del consentimiento. Por tanto, estaba disponible un total de 200 muestras para la inclusión en los análisis de datos. Para cada muestra FFPE se prepararon varios portaobjetos para el ensayo Xpert, para las pruebas IHC de ER, PR, HER2 y Ki67, y para la prueba FISH para la amplificación del gen HER2.

En general, Xpert Breast Cancer STRAT4 aportó resultados válidos en el primer intento de prueba para 99,5% (199/200) de las muestras en estudio. Una muestra que al principio produjo un resultado no determinado (**ERROR, NO VÁLIDO (INVALID)** o **SIN RESULTADO (NO RESULT)**) produjo un resultado de prueba después de una sola repetición. El índice de éxito general del ensayo fue del 100,0% (200/200).

De las 200 muestras con resultados válidos en la prueba Xpert, ESR1 y ERBB2 arrojaron un resultado válido positivo o negativo en la prueba el 100 % de las veces (200/200). En el caso de PGR y MKi67, la prueba Xpert arrojó un resultado válido positivo o negativo el 98,5 % de las veces (197/200) y el 97,0 % de las veces (194/200), respectivamente. Las 7

muestras con resultados indeterminados para PGR o MKi67 en la prueba Xpert se volvieron a analizar utilizando el método del lisado FFPE concentrado. Los resultados del original (primer intento) como de la repetición de la prueba se muestran en la Tabla 3.

En todo el conjunto de datos, incluidos los resultados de las repeticiones de las pruebas, la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 demostró un porcentaje de concordancia de positivos (PPA) del 97,2 %, un porcentaje de concordancia de negativos (NPA) del 95,0 %, y un porcentaje de concordancia global (PCG) del 97,0 % para ESR1 respecto a IHC;¹⁸ un PPA del 88,4 %, un NPA del 90,7 % y un PCG del 88,9 % para PGR respecto a IHC;¹⁸ un PPA del 100,0 %, un NPA del 92,4 % y un PCG del 93,3 % para ERBB2 respecto a IHC;¹⁹ y un PPA del 100 %, un NPA del 92,0 % y un PCG del 93,3 % para ERBB2 respecto a HER2 FISH.¹⁹ En el caso de MKi67 se obtuvo un PPA del 88,8 %, un NPA del 100 % y un PCG del 90,7 % con el umbral de IHC ajustado al >20 % para los positivos y del <10 % para los negativos. Las muestras intermedias en la prueba IHC de MKi67 (umbral de 10 %-20 %, ambos inclusive) se excluyeron del análisis. El PPA, el NPA y el PCG globales de cada diana se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Eficacia clínica

Comparación	Conjunto de datos ^a	Total (n) ^b	PPA	95% IC del	NPA	95% IC del	PCG	95% IC del
ESR1/ER Xpert frente a IHC	Original	199	97,2 % (174/179)	93,6-98,8	100 % (20/20)	83,9-100	97,5 % (194/199)	94,3-98,9
	Repetición de la prueba	199	97,2 % (174/179)	93,6-98,8	95,0 % (19/20)	76,4-99,1	97,0 % (193/199)	93,6-98,6
PGR/PR Xpert frente a IHC	Original	196	89,0 % (137/154)	83,0-93,0	92,9 % (39/42)	81,0-97,5	89,8 % (176/196)	84,8-93,3
	Repetición de la prueba	198	88,4 % (137/155)	82,4-92,5	90,7 % (39/43)	78,4-96,3	88,9 % (176/198)	83,8-92,5
ERBB2/HER2 Xpert frente a IHC	Original	180	100 % (22/22)	85,1-100	92,4 % (146/158)	87,2-95,6	93,3 % (168/180)	88,7-96,1
	Repetición de la prueba	180	100 % (22/22)	85,1-100	92,4 % (146/158)	87,2-95,6	93,3 % (168/180)	88,7-96,1
ERBB2/HER2 Xpert frente a FISH	Original	178	100 % (28/28)	87,9-100	92,0 % (138/150)	86,5-95,4	93,3 % (166/178)	88,6-96,1
	Repetición de la prueba	178	100 % (28/28)	87,9-100	92,0 % (138/150)	86,5-95,4	93,3 % (166/178)	88,6-96,1
ERBB2/HER2 Xpert frente a pruebas IHC + FISH	Original	197	100 % (27/27)	87,5-100	91,2 % (155/170)	86,0-94,6	92,4 % (182/197)	87,8-95,3
	Repetición de la prueba	197	100 % (27/27)	87,5-100	91,2 % (155/170)	86,0-94,6	92,4 % (182/197)	87,8-95,3
MKi67/Ki67 Xpert frente a IHC	Original	148	88,7 % (110/124)	81,9-93,2	100 % (24/24)	86,2-100	90,5 % (134/148)	84,7-94,3
	Repetición de la prueba	151	88,8 % (111/125)	82,1-93,2	100 % (26/26)	87,1-100	90,7 % (137/151)	85,0-94,4

^a Original = Lisado 1X de acuerdo con el contenido de las instrucciones de uso; Repetición de la prueba = Resultado de la repetición de la prueba con un lisado concentrado 4X en casos en los que la muestra original (lisado 1X) arrojó un resultado indeterminado para PGR o MKi67.

^b Se excluyeron las muestras con resultados no determinados o indeterminados en la prueba Xpert y las muestras con resultados equívocos o intermedios en la prueba IHC, las muestras con fallos IHC y las muestras con fallos en FISH.

19 Eficacia analítica

19.1 Sensibilidad analítica/entrada mínima del ensayo

La entrada mínima del ensayo se determinó evaluando el Ct máximo de CYFIP1 (gen de referencia) que determina con exactitud la entrada de muestra necesaria para conseguir un buen rendimiento del ensayo. Esa entrada de muestra asegura la obtención de resultados válidos en la mayoría de las muestras FFPE clínicas analizadas. Las muestras con un valor de Ct de CYFIP1 superior al permitido generarán un resultado **NO VÁLIDO (INVALID)**.

La sensibilidad analítica/entrada mínima del ensayo Xpert Breast Cancer STRAT4, definidas como el Ct de CYFIP1 máximo que da un 95 % o más de resultados válidos, se determinó utilizando diluciones de lisados de muestra clínica FFPE para poner a prueba el Ct de CYFIP1. Para evaluar la sensibilidad del Ct de CYFIP1, se hicieron diluciones sucesivas de lisado de muestra clínica FFPE y se analizaron dichas diluciones con N=20 réplicas por nivel de dilución durante 3 días hasta que el 95 % o menos de los resultados de la prueba fue válido. Los niveles de dilución incluyeron una muestra con la entrada mínima del ensayo esperada, dos niveles por debajo de dicha entrada y dos niveles por encima de ella. Las pruebas se realizaron en dos lotes de cartuchos del Xpert Breast Cancer STRAT4.

Antes del inicio del estudio, se realizó el límite de análisis de blanco con N=60 réplicas utilizando dos lotes independientes de cartuchos del Xpert Breast Cancer STRAT4. El límite de muestra de blanco consistió en una sección de parafina en blanco (sin muestra de tejido), y todos los resultados de la prueba mostraron la clasificación de resultado NO VÁLIDO (**NO VÁLIDO (INVALID)**) esperada. Las diluciones sucesivas de la entrada de muestra clínica de tejido FFPE a 1/1000 arrojaron 20/20 Ct de CYFIP1 válidos, con una media de Ct = 33,4 y una DE de 0,6 en el caso del lote 1 de la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4, y una media de Ct = 33,6 y una DE de 0,5 en el caso del lote 2. Otras diluciones con valores Ct CYFIP1 posteriores no cumplieron los resultados válidos de $\geq 95\%$ necesarios para el estudio. Tabla 4 resume el número de análisis de prueba válidos en cada nivel de entrada de muestra diluida de serie como Dilución relativa o como CYFIP1 Ct media. La sensibilidad analítica utilizando dos lotes de cartuchos de la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 demostró un requisito de entrada mínima del ensayo para un Ct de CYFIP1 = 33,4. Este valor, combinado con la variabilidad del ensayo, permitiría ajustar el límite de Ct de CYFIP1 = 35 superior para la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4.

Tabla 4. Entrada mínima del ensayo del Xpert Breast Cancer STRAT4

Lote del kit	Entrada de muestra (dilución relativa)	Media de Ct de CYFIP1	DE	Ciclo válido N (Ct ≤ 35)
00801 (Lote 1)	1/20	27,6	0,4	20/20
	1/100	29,8	0,3	20/20
	1/1000	33,4	0,6	20/20
	1/2000	34,2	0,5	9/20
	1/4000	34,5	0,5	2/20
	NTC	n/c	n/c	0/20
00903 (Lote 2)	1/20	27,8	0,3	20/20
	1/100	30,0	0,3	20/20
	1/1000	33,6	0,5	20/20
	1/2000	34,2	0,4	9/20
	1/4000	34,6	0,0	1/20
	NTC	n/c	n/c	0/20

19.2 Pruebas de interferencia

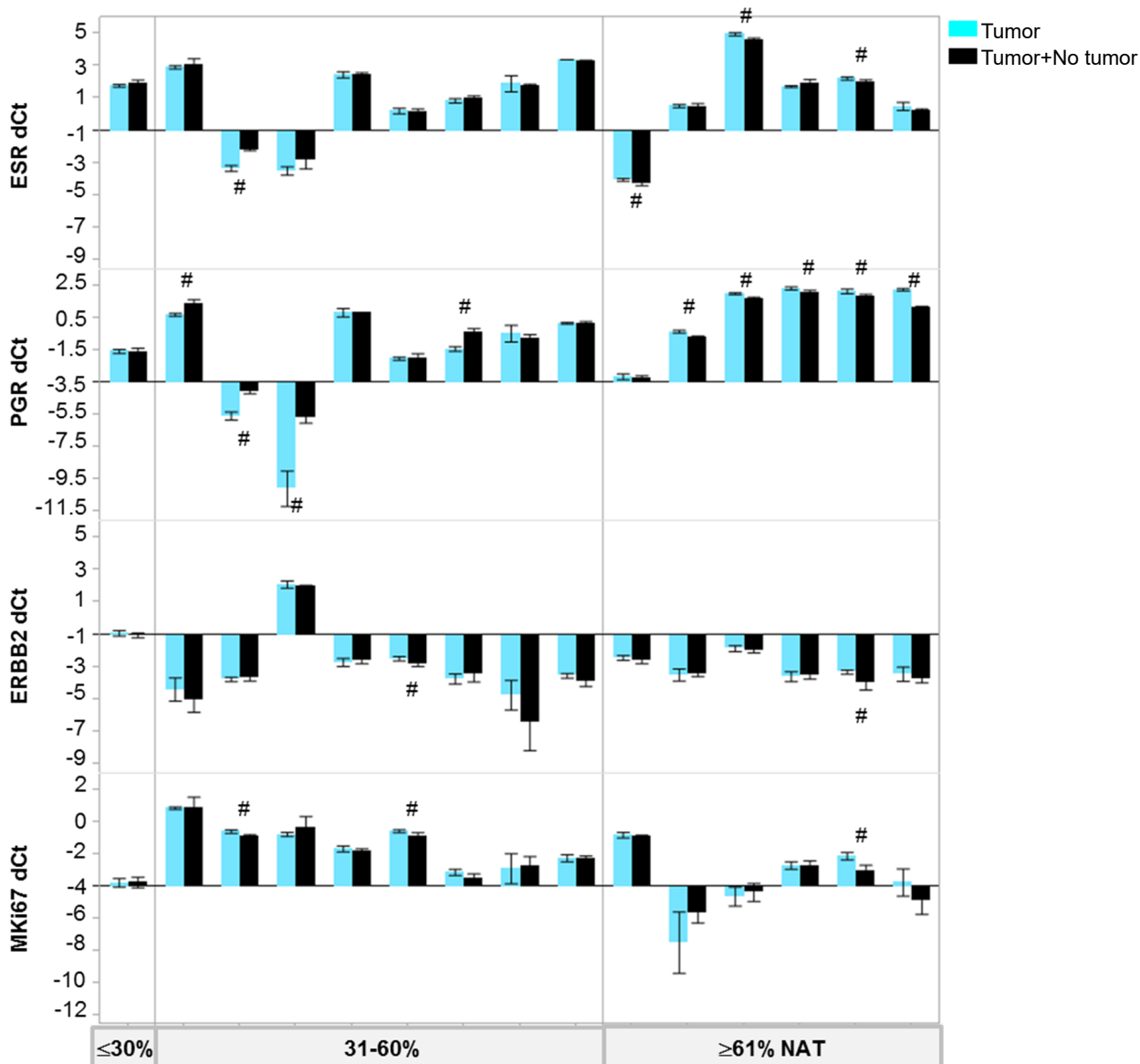
Tejido adyacente normal/no tumoral

Entre las muestras de tejido de cáncer de mama suele haber presentes tejidos adyacentes normales (no tumorales) (TAN) como contaminantes que pueden interferir en la detección de dianas específicas. La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 puede requerir que una sección FFPE de tumor de mama verificada anatomopatológicamente se macrodisecione para reducir al mínimo los posibles efectos de los contaminantes no tumorales en los casos en los que un anatomopatólogo lo considere procedente. Para evaluar el efecto de los tejidos adyacentes normales/no tumorales, se utilizó la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4, con y sin macrodissección, para analizar quince (15) bloques de tejido FFPE con carcinoma de mama invasivo que contenían entre un 21 y un 98 % de TAN alrededor. Las pruebas con el Xpert Breast Cancer STRAT4 se realizaron con N=4 réplicas del mismo lisado por condición. Los dCt de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67 de cada muestra de tejido con macrodissección (barras azules) o sin macrodissección (barras negras) se evaluaron primero mediante un ANOVA

de una vía para determinar la interferencia estadística del TAN. La interferencia clínicamente significativa por parte del TAN se consideró presente cuando el ddCt (Ct delta-delta) entre las muestras macrodisseccionadas y no macrodisseccionadas fue $>1,0$ y hubo un cambio en el resultado de la prueba. Los resultados del estudio se resumen en la Figura 6.

Los dCt de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67 de todas las 15 muestras se agruparon según el porcentaje de TAN ($\leq 30\%$, $31-60\%$ o $\geq 61\%$). Los gráficos de barras verticales azules y negras con DE representan medias de dCt de dianas de $N=4$ réplicas de secciones FFPE macrodisseccionadas y no macrodisseccionadas de un bloque de cáncer de mama invasivo FFPE. Todos los 15 bloques FFPE ($N=1$ TAN por debajo del 30% , $N=8$ TAN con $31-60\%$ y $N=6$ TAN por encima del 60%) mostraron o bien ninguna significación estadística de la interferencia de tejido adyacente normal/no tumoral según los análisis ANOVA de una vía con valor $p \geq 0,05$, o bien ninguna significación clínica (marcada como #) si la variación en los valores de Ct delta de cada diana entre las muestras macrodisseccionadas y no macrodisseccionadas fue $\leq 1,0$ o cuando los resultados de la prueba de las dianas (positivo, negativo) permanecieron no afectados.

Figura 6. Interferencia del tejido adyacente normal/no tumoral en los dCt de dianas del Xpert Breast Cancer STRAT4



Tejido de carcinoma ductal in situ, necrótico y hemorrágico

Para evaluar el efecto de los tejidos de carcinoma ductal in situ, necrótico y hemorrágico, se analizó un total de 9 muestras de tumor de mama FFPE (3 bloques de tumor de mama FFPE con 3-61 % de carcinoma ductal in situ, 3 bloques FFPE con 10-65 % de tejido necrótico y 3 bloques FFPE con 15-41 % de tejido hemorrágico) con la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 con y sin macrodissección. La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 se realiza con N=4 réplicas del mismo lisado por condición. En todas las condiciones de la prueba se observó que las diferentes contaminaciones de tejido de carcinoma ductal in situ, necrótico y hemorrágico no tuvieron ningún efecto estadístico o clínicamente significativo al utilizar la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 (no se muestran datos gráficos).

ADN genómico humano (ADNgh)

La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 utiliza cebadores y sondas altamente específicos para hibridar eficientemente con las plantillas de ARNm de ESR1, PGR, ERBB2 y MKI67 diana provenientes de un combinado de ácidos nucleicos genómicos (ADN genómico humano = ADNgh). Para evaluar el efecto del ADNgh en la prueba Xpert Breast Cancer STRAT4, se macrodisseccionaron 10 bloques de tumor de mama FFPE con diferentes contenidos de células de carcinoma ductal invasivo y se analizaron con y sin la adición de 25 ng de ADNgh a los lisados de las muestras FFPE utilizando la

prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 en N=4 réplicas del mismo lisado por condición. En todas las condiciones de la prueba se observó que la interferencia del ADNgh no tuvo ningún efecto estadístico o clínicamente significativo (no se muestran datos gráficos).

19.3 Contaminación por arrastre

Se llevó a cabo un estudio para demostrar que los cartuchos GeneXpert autónomos de un solo uso reducen al mínimo la contaminación por arrastre en muestras negativas procesadas después de muestras positivas muy altas en el mismo módulo GeneXpert. El estudio consistió en una muestra negativa procesada en el mismo módulo GeneXpert inmediatamente después de una muestra altamente positiva en ESR1/PGR/ERBB2/MKi67. La muestra negativa consistió en ARN transcrito *in vitro* (TIV) que contenía transcrito de CYFIP1 a 5×10^4 copias para asegurar la presencia de una diana de gen de referencia. La muestra positiva alta consistió en ARN TIV que contenía transcrito de CYFIP1 a 5×10^5 copias, y ARN TIV que contenía transcritos de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67 a 5×10^6 copias, preparada como lisado FFPE. El programa de análisis se repitió 41 veces en un único módulo GeneXpert para un total de 20 muestras positivas altas y 21 muestras negativas. Todas las 20 muestras positivas altas dieron correctamente POSITIVO (POSITIVE) en ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 y todas las 21 muestras negativas dieron correctamente NEGATIVO (NEGATIVE) en ESR1/PGR/ERBB2/MKi67.

19.4 Reproducibilidad y precisión del ensayo

La reproducibilidad del Xpert Breast Cancer STRAT4 se evaluó utilizando un grupo de cinco muestras de lisado.

Tres de los miembros del grupo se prepararon añadiendo ARN transcrito *in vitro* (TIV) a un tampón de lisis FFPE enriquecido a ~2 Ct delta de los valores de corte de Ct delta de ESR1 (ARN TIV 1), PGR (ARN TIV 2) y ERBB2 (ARN TIV 3), y con valores de Ct de CYFIP1 a ~2-3 Ct del nivel de entrada mínimo del ensayo.

Dos miembros del grupo (muestra FFPE clínica 4 y muestra FFPE clínica 5) fueron creados a partir de muestras FFPE clínicas combinadas en tampón de lisis de FFPE para generar valores de Ct de CYFIP1 cercanos a la entrada mínima del ensayo y con valores de corte de dCt para todas las dianas a lo largo del intervalo notificable y, en la medida de lo posible, cercanos a los valores de corte de dCt del ensayo.

Dos operadores en cada uno de los tres centros del estudio analizaron dos grupos de cinco muestras por día durante seis días de análisis (cinco muestras x seis días x dos operadores x dos réplicas x tres centros). Se analizó un total de 72 réplicas por muestra. Se utilizaron tres lotes de cartuchos del Xpert Breast Cancer STRAT4 en cada uno de los tres centros de análisis. La prueba Xpert Breast Cancer STRAT4 se realizó siguiendo el procedimiento de estas instrucciones de uso.

La reproducibilidad del Xpert Breast Cancer STRAT4 se evaluó en términos del Ct delta de cada una de las cuatro dianas para cada grupo. La media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) entre centros, entre lotes, entre días, entre operadores e intraensayo correspondientes a cada miembro del grupo de muestras se presentan en Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los datos de reproducibilidad

Muestra	Canal del ensayo (analito)	N ^a	Media de dCt	Entre centros		Entre lotes		Entre días		Entre operadores		Intraensayo		Total	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
1-ARN TIV	ESR1	72	0,20	0,00	0,00	0,03	29,30	0,00	0,00	0,00	1,80	0,07	68,90	0,11	0,33
	PGR	72	-0,03	0,00	0,00	0,01	14,70	0,00	2,30	0,00	0,00	0,06	83,00	0,07	0,26
	ERBB2	72	-2,42	0,00	0,00	0,04	27,90	0,02	11,40	0,00	2,60	0,08	58,10	0,13	0,36
	MKi67	70	-2,55	0,00	0,00	0,32	62,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	37,90	0,52	0,72
2-ARN TIV	ESR1	72	-1,03	0,00	1,60	0,01	9,20	0,01	5,50	0,00	0,00	0,10	83,70	0,12	0,35
	PGR	72	-1,26	0,00	0,00	0,01	12,20	0,00	0,00	0,01	10,70	0,04	77,10	0,05	0,23
	ERBB2	72	-3,49	0,01	4,80	0,03	31,60	0,00	0,00	0,00	0,40	0,07	63,20	0,11	0,33
	MKi67	72	-3,53	0,00	0,00	0,08	49,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	51,00	0,16	0,40
3-ARN TIV	ESR1	72	3,64	0,00	0,00	0,01	8,40	0,01	16,50	0,00	0,00	0,06	75,10	0,08	0,29
	PGR	72	3,34	0,00	3,40	0,00	0,00	0,01	9,70	0,00	5,40	0,05	81,50	0,06	0,25
	ERBB2	72	0,91	0,02	20,60	0,01	10,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	69,10	0,08	0,28
	MKi67	72	1,14	0,00	0,00	0,02	15,40	0,02	18,00	0,00	0,00	0,07	66,60	0,10	0,31

Muestra	Canal del ensayo (analito)	N ^a	Media de dCt	Entre centros		Entre lotes		Entre días		Entre operadores		Intraensayo		Total	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
4-Muestra clínica FFPE	ESR1	72	-0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,40	0,00	15,90	0,02	69,70	0,03	0,17
	PGR	72	-1,99	0,00	6,30	0,01	19,70	0,00	2,50	0,00	0,00	0,02	71,60	0,03	0,18
	ERBB2	72	-2,39	0,02	31,30	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00	3,70	0,05	62,80	0,07	0,27
	MKI67	72	-0,93	0,00	0,00	0,02	36,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	63,50	0,04	0,21
5-Muestra clínica FFPE	ESR1	72	-2,83	0,00	0,00	0,05	13,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	86,30	0,39	0,63
	PGR	72	-5,66	0,00	0,00	0,02	3,60	0,03	4,40	0,00	0,00	0,56	92,00	0,60	0,78
	ERBB2	72	1,93	0,00	2,90	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	94,20	0,03	0,17
	MKI67	72	-1,57	0,00	1,70	0,01	17,10	0,01	9,00	0,00	11,10	0,05	61,10	0,09	0,29

^a Resultados con valores de Ct delta válidos de entre 72

20 Bibliografía

1. Asociación Americana del Cáncer, Datos y cifras sobre el cáncer 2015. Atlanta, GA: Asociación Americana del Cáncer, 2015.
2. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y Organización Mundial de la Salud (OMS). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
3. Asociación Americana del Cáncer, Datos y cifras sobre el cáncer 2013-2014, Atlanta, GA: Asociación Americana del Cáncer, 2013.
4. Rose C, Thorpe SM, Lober J, Deenfeldt J, Palshof T, Mouridsen HT. Therapeutic effect of tamoxifen related to estrogen receptor level. *Recent Results Cancer Res* 1980; 71:134-41.
5. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuschler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg* 1993; 218:13-21.
6. Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1991;9:1283-1297.
7. Fisher KB, Redmond KC, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, Escher G, Lippman M, Savlov E, Wittliff J. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1:227-241.
8. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression; comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105.
9. Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84:219-225.
10. Fasching PA, Heusinger K, Haerberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C, Schulz-Wendtland R, Bani MR, Schrauder M, Kahmann L, Lux MP, Strehl JD, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Wachter DL. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 Nov 14; 11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
11. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008 Aug;17(4):323-34.
12. de Matos LL, Truffelli DC, Luongo de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights* 2010;5, 9-20
13. Roepman P, Horlings HM, Krijgsman O, Kok M, Bueno-de-Mesquita JM, Bender R, Linn SC, Glas AM, van de Vijver MJ. Microarray-Based Determination of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Status in Breast Cancer *Clin Cancer Res* 2009; 15(22) 7003-11.
14. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Bayde S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Magnu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134:907-922.

15. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013; 31(31): 3997-4013.
16. REGLAMENTO (CE) N.º 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre el etiquetado de clasificación y el envasado de sustancias y mezclas que modifica y anula la Lista de Declaraciones de Precaución, Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE (que modifica la normativa (CE) N.º 1907/2006).
17. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
18. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 (134).
19. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 (138), 241-256.

21 Oficinas centrales de Cepheid

Sede central corporativa

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Teléfono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede central europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Teléfono: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

22 Asistencia técnica

Antes de ponerse en contacto con el servicio técnico de Cepheid, reúna la información siguiente:

- Nombre del producto
- Número de lote
- Número de serie del instrumento
- Mensajes de error (si los hubiera)
- Versión de software y, si corresponde, «Número de servicio técnico» (Service Tag) del ordenador

Estados Unidos




Teléfono: + 1 888 838 3222
Correo electrónico: techsupport@cepheid.com















Francia

Teléfono: + 33 563 825 319
Correo electrónico: support@cepheideurope.com

La información de contacto de todas las oficinas del servicio técnico de Cepheid está disponible en nuestro sitio web:
www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	<i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i>
	Marca CE: conformidad europea

Símbolo	Significado
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	No reutilizar
	Código de lote
	Consultar las instrucciones de uso
	Precaución
	Fabricante
	País de fabricación
	Contiene cantidad suficiente para n pruebas
	Control
	Fecha de caducidad
	Límites de temperatura
	Riesgos biológicos
	Representante autorizado en Suiza
	Importador



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



24 Historial de revisiones

Apartado	Descripción del cambio
Tabla de símbolos	Se añadieron los símbolos y definiciones de CH REP a la tabla de símbolos. Se añadió la información de CH REP e importador con la dirección en Suiza.
Historial de revisiones	Se actualizó la tabla de Historial de revisiones.