

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Návod k použití

CE **IVD**

Prohlášení o ochranných známkách, patentech a autorských právech

Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert®, and Xpert® are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries.

All other trademarks are the property of their respective owners.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THESE INSTRUCTIONS FOR USE. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

© 2017—2025 Cepheid.

Cepheid,® logo Cepheid, GeneXpert® a Xpert® jsou ochranné známky společnosti Cepheid registrované v USA a dalších zemích.

Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

NÁKUPEM TOHOTO PRODUKTU SE NA KUPUJÍCÍHO PŘEVÁDÍ NEPŘEVODITELNÉ PRÁVO PRODUKT POUŽÍVAT V SOULADU S TÍMTO NÁVODEM K POUŽITÍ. NEPŘEVÁDÍ SE ŽÁDNÁ DALŠÍ PRÁVA, A TO VÝSLOVNĚ, NEPŘÍMO ANI PODLE ZÁSADY ESTOPPEL. DÁLE SE S PRODEJEM TOHOTO PRODUKTU NEPŘEVÁDÍ ŽÁDNÁ PRÁVA NA OPAKOVANÝ PRODEJ.

© 2017—2025 Cepheid.

Podrobný seznam změn viz Historie revizí.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *In Vitro*

1 Vlastnický název

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Běžný nebo obvyklý název

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Určené použití

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je semikvantitativní analýza založená na polymerázové řetězové reakci s kvalitativními hodnotami cut-off pro mRNA estrogenového receptoru (*ESR1*), progesteronového receptoru (*PGR*), receptoru pro lidský epidermální růstový faktor 2 (*ERBB2/HER2*) a proliferačního markeru Ki-67 (*MKi67*) izolované z tkáně invazivní rakoviny prsu fixované formalínem a zalité v parafinu (FFPE). RNA se extrahuje z mikroskopického řezu tkáně z oblasti obohacené nádorem identifikované patologem. Test je určen k použití ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními daty ke klasifikaci tkáně rakoviny prsu s ohledem na stav hormonálních receptorů, stav receptoru HER2 a stav proliferačního markeru. Test je určen k použití se systémem GeneXpert[®], který zahrnuje izolaci RNA z tkáně FFPE a amplifikaci a detekci cílových sekvencí v kazetě.

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 není určen jako:

- Prediktor závažnosti onemocnění
- Samostatný prostředek pro diagnostické testování rakoviny prsu
- Prostředek ke stanovení prognózy recidivy onemocnění

Indikace k použití: Test je určen ke zhodnocení hladin mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67* ve tkáních invazivní rakoviny prsu získaných z pacientů a připravených do formy vzorků FFPE a je určen jako pomůcka pro klinické zhodnocení ve spojení s dalšími laboratorními daty.

4 Souhrn a vysvětlení

Rakovina prsu je jednou z nejčastějších rakovin u žen po celém světě a každý rok přibývá přibližně 1,7 miliónů nových případů rakoviny prsu.¹ V Evropě je každý rok diagnostikováno přibližně 494 000 nových případů a 143 000 pacientů na jejich onemocnění zemře. V USA bylo v roce 2015 diagnostikováno přibližně 200 000 nových případů invazivní rakoviny prsu.² Rakovina prsu je nejčastější příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou u žen v rozvojových zemích a druhou nejčastější příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou (po rakovině plic) u žen ve vyspělých zemích.²

Dle dat WHO z roku 2020 je u žen rakovina prsu nejčastěji diagnostikovanou rakovinou a je hlavní příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou.¹ Úmrtnost na rakovinu prsu se od roku 1990 snížila o 34 procent, z velké části díky zlepšení léčby a časně detekci.³ Měření exprese proteinů ER a PR je prostředek ke stanovení prognózy výsledků rakoviny prsu a predikuje odezvu na léčbu tamoxifenem a jiné hormonální léčby.^{4,5,6,7} Nadměrná exprese HER2 znamená u žen s rakovinou prsu nepříznivou prognózu, ale důležitější je, že nadměrná exprese proteinu HER2 (*ERBB2*) nebo amplifikace genu HER2 predikují odezvu na léčbu trastuzumabem nebo jiné léčby cílené na HER2.⁸ Proliferační marker Ki-67 (*MKi67*) byl rozsáhle studován v retrospektivních studiích zahrnujících pacienty s rakovinou prsu⁹ a považuje se za důležitý indikátor potřeby chemoterapie.¹⁰ Metaanalýzy ukázaly, že je spojen s horšími výsledky, co se týče přežití u časně rakoviny prsu.¹¹ Vzhledem

k tomu, jak jsou tyto markery důležité pro výběr účinného léčebného režimu pro pacienty s rakovinou prsu, doporučují léčebné směrnice od společnosti European Society for Medical Oncology (ESMO), aby všechny primární karcinomy prsu byly v době stanovení diagnózy otestovány na ER, PR, HER2 (ERBB2) a Ki67.¹²

Imunohistochemie (IHC) se běžně používá k měření exprese proteinů ER, PR, HER2 a Ki67. Pro expresi HER2 se typicky jako první provádí IHC test a výsledky se ohlašují na stupnici od 0 do 3+. Pokud je výsledek exprese HER2 nejednoznačný (2+), provede se reflexní test vzorku na HER2 metodou hybridizace in situ (ISH), jako jsou fluorescenční hybridizace in situ (FISH) nebo chromogenní hybridizace in situ (CISH), které zjišťují amplifikaci genu HER2.¹³ Pro metody IHC a ISH byla při mezilaboratorním porovnání prokázána vysoká míra variability výsledků, převážně kvůli rozdílům v protilátkách používaných pro IHC a subjektivitě v interpretačních metodách.¹⁴

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je test pro diagnostiku in vitro používaný ke stanovení hladin exprese mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67* izolované ze vzorků FFPE z tkáně invazivní rakoviny prsu.

Test se provádí v soběstačné kazetě po krátkém kroku přípravy lyzátu vzorku prováděném mimo systém, vyžaduje méně než 15 minut manipulace a celková doba vydání výsledků je méně než 2 hodiny.

5 Princip postupu

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je test využívající polymerázovou řetězovou reakci s (RTPCR) v reálném čase k detekci mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67* izolované z tkání invazivních nádorů prsu fixovaných formalínem a zalitých v parafín (FFPE). Test se provádí na přístrojových systémech Cepheid GeneXpert. Přístrojové systémy GeneXpert automatizují a integrují purifikaci vzorku, amplifikaci nukleových kyselin a detekci cílové sekvence v jednoduchých nebo komplexních vzorcích pomocí RT-PCR v reálném čase. Systém sestává z přístroje, snímače čárových kódů, počítače a předem načteného softwaru pro zpracování testů a zobrazení výsledků. Systémy používají jednorázové kazety GeneXpert, které obsahují reagentie RT-PCR a ve kterých probíhají procesy RT-PCR. Úplný popis systémů najdete v příslušné Příručce obsluhy přístrojového systému GeneXpert (GeneXpert Instrument System Operator Manual).

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 obsahuje reagentie pro současnou detekci *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, referenční gen cytoplasmatického proteinu 1 interagujícího s FMR1 (CYFIP1), vnitřní kontrolu RT-PCR (CIC) a vnitřní systém kontroly sondy (PCC). Referenční gen ověřuje vhodnost vzorku a používá se k normalizaci hladin exprese mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67*. Vnitřní kontrola RT-PCR (CIC) se používá k ověření, že reakce RT-PCR proběhla správně. PCC ověřuje rehydrataci reagenčních perliček, plnění RT-PCR zkumavky, neporušenost sond a stabilitu barviva v kazetě. Celkově test používá šest různých fluorescenčních kanálů pro detekci cílů nebo kontroly/reference s jejich vlastními parametry cut-off pro platnost cílů/kontroly/reference.

Vzorky FFPE musí být nejprve ošetřeny lyzační soupravou FFPE Xpert® tak, že se připraví tkáňový řez o tloušťce 4–5 µm (mikronů) a v případě nutnosti se na tkáni FFPE nejprve provede makrodisekce, pomocí které se obohatí oblast invazivního nádoru, a poté se tkáň seškrábne a vloží do zkumavky společně s doporučenými objemy lyzační reagentie FFPE a proteinázy K. Roztok se poté inkubuje v termobloku při teplotě 80 °C po dobu 30 minut. Následně se vzorek smíchá s etanolem a poté se doporučený objem připraveného lyzátu vzorku přidá přímo do testovací kazety. Testovací kazeta se vloží do modulu přístrojového systému GeneXpert, kde systém provede plně automatizovanou a zcela integrovanou purifikaci, amplifikaci a detekci nukleových kyselin v reálném čase. Všechny reagentie potřebné pro přípravu vzorku v systému a analýzu RT-PCR jsou předem vloženy v kazetě. Nukleové kyseliny v lyzátu jsou zachyceny na filtr, promyty a eluovány sonikací. Purifikované nukleové kyseliny se smíchají s vysušenými reagentiemi RT-PCR a roztok se přenese do reakční zkumavky, kde proběhne RT-PCR a detekce. Doba do vydání výsledku s přístrojem GeneXpert je přibližně 75 minut.

Detekční hodnoty cut-off, které test Xpert Breast Cancer STRAT4 používá v každém fluorescenčním kanálu, byly stanoveny tak, aby se maximalizovaly pozitivní, negativní a celkové procentuální shody v porovnání s referenčními laboratorními výsledky IHC nebo IHC/FISH pro každý cíl. IHC pro ER, PR, Ki67 a HER2 a FISH pro HER2 byly zpracovány a ohodnoceny podle pokynů v návodu k použití. Interpretace výsledků byla provedena podle směrnice ASCO/CAP 2013.¹⁵ Nádory byly klasifikovány jako ER nebo PR pozitivní metodou IHC, když ≥ 1 % invazivních nádorových buněk vykazovalo jednoznačné barvení jader bez ohledu na intenzitu barvení. Exprese HER2 byla vyhodnocena soupravou HercepTest (IHC) (Dako) a ohodnocena jako 0, 1+, 2+, nebo 3+. Nádory se skóre 2+ byly reflexně otestovány na HER2 metodou FISH pomocí soupravy HER2 DNA sondy PathVysion (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Případy byly považovány za HER2 pozitivní, pokud měly skóre 3+ metodou IHC a/nebo byly amplifikovány metodou FISH (definováno jako HER2:CEP17 (poměr $\geq 2,0$) a/nebo průměrný počet kopií HER2 $\geq 6,0$ signálů/buňka dle dokumentu 2013 ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update for HER2 Testing in Breast Cancer).¹⁵ Pro Ki67 byly nádory klasifikovány jako pozitivní (vysoké), když ≥ 20 % invazivních nádorových buněk vykazovalo jednoznačné barvení jader bez ohledu na intenzitu barvení.

V případě referenční genové kontroly a vnitřní kontroly RT-PCR definují detekční hodnoty cut-off rozsahy minimálních a maximálních hodnot prahu cyklů (Ct) PCR, které zjišťují platný výsledek, dostatečný minimální vstup vzorku a nepřítomnost inhibice PCR. V případě cílů ESR1, PGR, ERBB2 a MKi67 jsou detekční hodnoty cut-off definovány hodnotami delta prahu cyklů (dCt) (Ct referenčního genu mínus Ct cílového genu), které zjišťují POZITIVNÍ (POSITIVE) vs. NEGATIVNÍ (NEGATIVE) výsledky pro daný cíl v kanálu.

6 Reagencie a přístroje

6.1 Dodaný materiál

Souprava Xpert Breast Cancer STRAT4 obsahuje dostatečné množství reagentů na zpracování 10 vzorků kontroly kvality nebo lyzátů FFPE připravených lyzační soupravou Xpert FFPE Lysis Kit (katalogové č. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Souprava Xpert Breast Cancer STRAT4 obsahuje následující položky:

Kazety Xpert Breast Cancer STRAT4 s integrovanými reakčními zkumavkami	10
• Perličky 1, 2 a 3 (sušené mrazem) • Proplachovací reagencie • Eluční reagencie	1 v každé kazetě 1,0 ml v každé kazetě 2,0 ml v každé kazetě
CD	1 v každé soupravě
• Soubor definice analýzy (ADF) • Návod k použití	

Poznámka

Bezpečnostní listy (SDS) jsou k dispozici na adrese www.cepheid.com nebo www.cepheidinternational.com na kartě **PODPORA (SUPPORT)**.

Poznámka

Hovězí sérový albumin (BSA) v perličkách v tomto produktu byl vyroben výhradně z hovězí plazmy pocházející ze Spojených států amerických. Zvířata nebyla krmena bílkovinami pocházejícími z přežvýkavců či jiných zvířat; zvířata prošla testy ante-mortem i post-mortem. V průběhu zpracování nedocházelo k žádnému směšování materiálů s jinými zvířecími materiály.

7 Skladování a manipulace

- Obsah soupravy Xpert Breast Cancer STRAT4 skladujte při teplotě 2–28 °C.
- Víko kazety neotevírejte, dokud nejste připraveni k provedení testu.
- Kazetu použijte do 30 minut od otevření víka.
- Nepoužívejte kazetu, která vytekla.

8 Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

- Lyzační souprava FFPE Xpert (katalogové č. GXFFPE-LYSIS-CE-10) pro přípravu lyzátů FFPE. Tato souprava je tvořena lyzační reagenty FFPE, proteinázou K (PK), 1,5ml zkumavkami a 5ml lahvičkami.
- Míchačka vortex.
- Pipety a pipetovací špičky s filtrem proti aerosolu vhodné pro pipetování 600 µl, 1,2 µl a 520 µl.
- Počítač s proprietárním softwarem GeneXpert verze 4.7b nebo vyšší nebo Xpertise verze 6.4b nebo vyšší, čtečka čárových kódů a příslušná příručka obsluhy k přístrojovému systému GeneXpert.
- Tiskárna: Pokud požadujete tiskárnu, kontaktujte technickou podporu společnosti Cepheid a sjednejte si nákup doporučené tiskárny.

9 Varování a bezpečnostní upozornění

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Se všemi biologickými vzorky je nutné zacházet, jako kdyby byly schopné přenášet infekční agens. Se všemi lidskými vzorky je nutné zacházet se standardními bezpečnostními opatřeními. Směrnice pro zacházení se vzorky jsou dostupné u Světové zdravotnické organizace (World Health Organization) nebo u Center pro kontrolu a prevenci nemocí v USA (Centers for Disease Control and Prevention).
- Při práci s chemikáliemi a manipulaci s biologickými vzorky dodržujte bezpečnostní postupy vašeho zdravotnického zařízení.
- Funkční charakteristiky tohoto testu byly stanoveny s typy vzorků, které uvádí Část 3. Funkčnost tohoto testu s jinými typy vzorků nebyla vyhodnocena.
- Tkáně FFPE musí být zpracovány lyzační soupravou FFPE Xpert (katalogové č. GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Neúplné odstranění (seškrábnutí) oblasti nádoru ze sklíčka při přípravě lyzátu FFPE může vést k nedostatku materiálu pro analýzu, což může znamenat vyšší než očekávanou míru výskytu neurčitých/neplatných výsledků s testem Xpert Breast Cancer STRAT4.
- Víko kazety Xpert Breast Cancer STRAT4 otevírejte, jen když přidáváte připravený lyzát FFPE.
- Nepoužívejte kazetu, která po vyjmutí z obalu upadla.
- Kazetou netřepte. Třesení nebo upuštění kazety po otevření víka kazety může způsobit neplatné výsledky.
- Nepoužívejte kazetu s poškozenou reakční zkumavkou.
- Každá jednorázová kazeta testu Xpert Breast Cancer STRAT4 se používá ke zpracování jednoho testu. Použité kazety nepoužívejte opakovaně.
- Nepoužívejte kazetu, pokud se zdá být vlhká nebo pokud se zdá, že je porušené těsnění víka.
- Štítek s ID vzorku neumísťte na víko kazety ani na štítek s čárovým kódem.
- Při manipulaci se vzorky se doporučuje správná laboratorní praxe včetně výměny rukavic mezi manipulacemi se vzorky pacientů, aby se zabránilo kontaminaci vzorků nebo reagentů.
- Ohledně správné likvidace použitých kazet a nepoužitých reagentů se poraďte s pracovníky vašeho zdravotnického zařízení odpovědnými za ekologickou likvidaci odpadu. Ověřte si státní, regionální nebo místní předpisy, protože se mohou lišit od národních předpisů pro likvidaci. Materiál může vykazovat charakteristiky nebezpečného odpadu vyžadujícího speciální likvidaci. Zdravotnická zařízení si musí ověřit své požadavky na likvidaci nebezpečného odpadu.

10 Chemická nebezpečí^{16,17}

Podle Globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií (GHS) se tento materiál nepovažuje za nebezpečný.

11 Odběr, přeprava a skladování vzorků

- Používejte pouze vzorky FFPE zpracované lyzační soupravou Xpert FFPE Lysis Kit (katalogové č. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Dodržujte směrnici ASCO/CAP¹⁵ pro přípravu tkáně FFPE.
- Lyzát FFPE je nutné připravit z bloku nádoru FFPE s největší oblastí životaschopných buněk karcinomu prsu (nejméně 30 % buněk nádoru) a před testováním s testem Xpert Breast Cancer STRAT4 je potřeba v případě nutnosti provést manuál makrodisekci. Pro vzorky nádoru o velikosti méně než 10 mm² s méně než 30 % nádoru může být k dosažení platných výsledků nutné použít postup s koncentrovaným lyzátem nebo více než jeden řez o tloušťce 4–5 µm.
- Lyzát FFPE je nutné přepravit do laboratoře při teplotě 2–8 °C.
- Lyzát FFPE je před testováním testem Xpert Breast Cancer STRAT4 stabilní po dobu až 1 týdne při teplotě 2–8 °C nebo po dobu až 4 týdnů při teplotě ≤ -20 °C. Při dlouhodobém skladování ho skladujte při teplotě -80 °C. Nedoporučuje se provádět více než 1 zmrazení a rozmrazení. Lyzát FFPE rozmrazujte při pokojové teplotě a před použitím ho promíchejte na míchačce vortex po dobu 15 sekund.

12 Postup

Důležité Používání kazet Xpert Breast Cancer STRAT4 vyžaduje přípravu lyzátu pomocí lyzační soupravy FFPE Xpert (referenční č. GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Důležité Test zahajte do 30 minut od přidání připraveného vzorku do kazety.

12.1 Příprava lyzátu FFPE

Lyzát FFPE připravte podle návodu k použití lyzační soupravy FFPE.

12.2 Příprava kazety

1. Vyjměte kazetu z kartónového obalu.
2. Připravený lyzát FFPE před použitím promíchejte na míchačce vortex po dobu 15 sekund.
3. Otevřete víko kazety.
4. Napipetujte 520 µl lyzátu FFPE do vzorkové komory kazety. (Poznámka: může být přítomno malé množství precipitátu, které nemá vliv na výkon testu.)

Zbývající lyzát FFPE uschovejte při teplotě 2–8 °C nebo ≤ -20 °C pro případ, že bylo nutné test zopakovat.



Obrázek 1. Kazeta Xpert Breast Cancer STRAT4 (pohled shora)

5. Zavřete víko kazety. Ujistěte se, že víko pevně zapadne na místo.

12.3 Spuštění testu

Důležité Před spuštěním testu se ujistěte, že do softwaru byl importován soubor definice analýzy Xpert Breast Cancer STRAT4 (ADF).

Tato část uvádí výchozí kroky k obsluze systému GeneXpert. Podrobné pokyny viz *Příručka obsluhy systému GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)* nebo *Příručka obsluhy systému GeneXpert Infinity (GeneXpert Infinity System Operator Manual)*, v závislosti na použitém přístroji.

Poznámka Postup se může lišit, pokud správce systému změnil výchozí pracovní postup systému.

1. Zapněte přístroj GeneXpert:
 - Pokud používáte přístroj GeneXpert Dx, nejprve zapněte přístroj GeneXpert Dx a poté počítač. Software GeneXpert se spustí automaticky, nebo může vyžadovat dvojité kliknutí na ikonu softwaru GeneXpert Dx na pracovní ploše systému Windows®.
 - nebo
 - Pokud používáte přístroj GeneXpert Infinity, zapněte přístroj. Software Xpertise se spustí automaticky, nebo může vyžadovat dvojité kliknutí na ikonu softwaru Xpertise na pracovní ploše systému Windows.
2. Pomocí svého uživatelského jména a hesla se přihlaste do softwaru systému přístroje GeneXpert. V okně systému GeneXpert klikněte na **Vytvořit test (Create Test)** (GeneXpert Dx) nebo klikněte na **Objednávky (Orders)** a **Objednat test (Order Test)** (Infinity). Otevře se okno Vytvořit test (Create Test) .
3. Oskenujte nebo zadejte ID vzorku (Sample ID). Pokud ID vzorku (Sample ID) zadáváte, dbejte, aby bylo zadáno správně. ID vzorku (Sample ID) je spojeno s výsledky testu a je zobrazeno v okně Zobrazit výsledky (View Results) a ve všech zprávách. Objeví se dialogové okno Naskenovat kazetu (Scan Cartridge).

4. Naskenujte čárový kód na kazetě Xpert Breast Cancer STRAT4. Zobrazí se okno Vytvořit test (Create Test). Pomocí informací z čárového kódu software automaticky vyplní následující pole: Výběr testu (Select Assay), ID šarže reagentie (Reagent Lot ID), Sériové číslo kazety (Cartridge SN).
5. Klikněte na **Zahájit test (Start Test)** (GeneXpert Dx) nebo **Odeslat (Submit)** (Infinity). Pokud je to požadováno, zadejte heslo.
6. U přístroje GeneXpert Dx:
 - a) Otevřete dvířka modulu přístroje s blikajícím zeleným světlem a založte kazetu.
 - b) Zavřete dvířka. Spustí se test a zelené světlo přestane blikat. Po dokončení testu světlo zhasne.
 - c) Před otevřením dvířek modulu počkejte, až systém uvolní zámek dveří. Vyjměte kazetu.
 - d) Použité kazety zlikvidujte do vhodné odpadové nádoby na vzorky podle standardní praxe vašeho zdravotnického zařízení. Viz Část 9.

nebo

U systému GeneXpert Infinity vložte kazetu na dopravníkový pás. Kazeta se založí automaticky, proběhne test a použitá kazeta vypadne do odpadové nádoby.

13 Zobrazení a tisk výsledků

Tato část uvádí základní kroky při zobrazení a tisku výsledků. Podrobnější pokyny k zobrazení a tisku výsledků viz *Příručka obsluhy systému GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)* nebo *Příručka obsluhy systému GeneXpert Infinity (GeneXpert Infinity System Operator Manual)* v závislosti na použitém přístroji.

1. Kliknutím na ikonu **Zobrazení výsledků (View Results)** zobrazíte výsledky.
2. Po dokončení testu zobrazte a/nebo vygenerujte soubor PDF se zprávou kliknutím na tlačítko **Zpráva (Report)** na obrazovce Zobrazení výsledků (View Results).

14 Kontrola kvality

Každý test obsahuje referenční genovou kontrolu (*CYFIP1*) a systém kontroly sondy (PCC).

- **Kontrola *CYFIP1*:** Tento referenční gen se používá k normalizaci hladin exprese *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67*. Rovněž slouží jako kontrola adekvátnosti vzorku (SAC), která zajišťuje, že vzorek obsahuje dostatek RNA. Aby byl výsledek testu platný, vyžaduje se alespoň minimální signál *CYFIP1*. Signál *CYFIP1* pod minimální intenzitou nebo negativní signál značí, že vzorek neobsahuje dostatek RNA.
- **Alternativní *CYFIP1*:** Toto je duplicitní kontrola *CYFIP1* používaná v algoritmu, když je hodnota delta prahu cyklů (dCt) *PGR* nebo *MKi67* pod nastavenou hodnotou cut-off testu. Pro tyto cíle je navíc potřeba alespoň minimální signál alternativní *CYFIP1*, aby byl výsledek testu platný.
- **Systém kontroly sondy (PCC):** Před zahájením PCR měří přístrojový systém GeneXpert fluorescenční signál ze sond a monitoruje tak rehydrataci perliček, plnění reakční zkumavky, neporušenost sond a stabilitu barviva. PCC vyhovuje, pokud splňuje validovaná kritéria přijatelnosti.
- **Externí kontroly (nejsou součástí dodávky):** Externí kontroly by se měly používat v souladu s požadavky místních, státních a federálních akreditačních organizací, pokud je to relevantní.

15 Interpretace výsledků

Výsledky jsou interpretovány automaticky přístrojovým systémem GeneXpert z naměřených fluorescenčních signálů a vložených výpočetních algoritmů a jsou zřetelně zobrazeny v okně Zobrazení výsledků (View Results) na kartách Výsledky testu (Test Results) a Výsledek analytů (Analyte Result). Výsledek testu (Test Result) a Výsledky analytů (Analyte Results) jsou rovněž uvedeny ve Zprávě o testu (Test Report). Všechny možné výsledky uvádí Tabulka 1 a Tabulka 2.

Tabulka 1. Všechny možné výsledky pro test Xpert Breast Cancer STRAT4

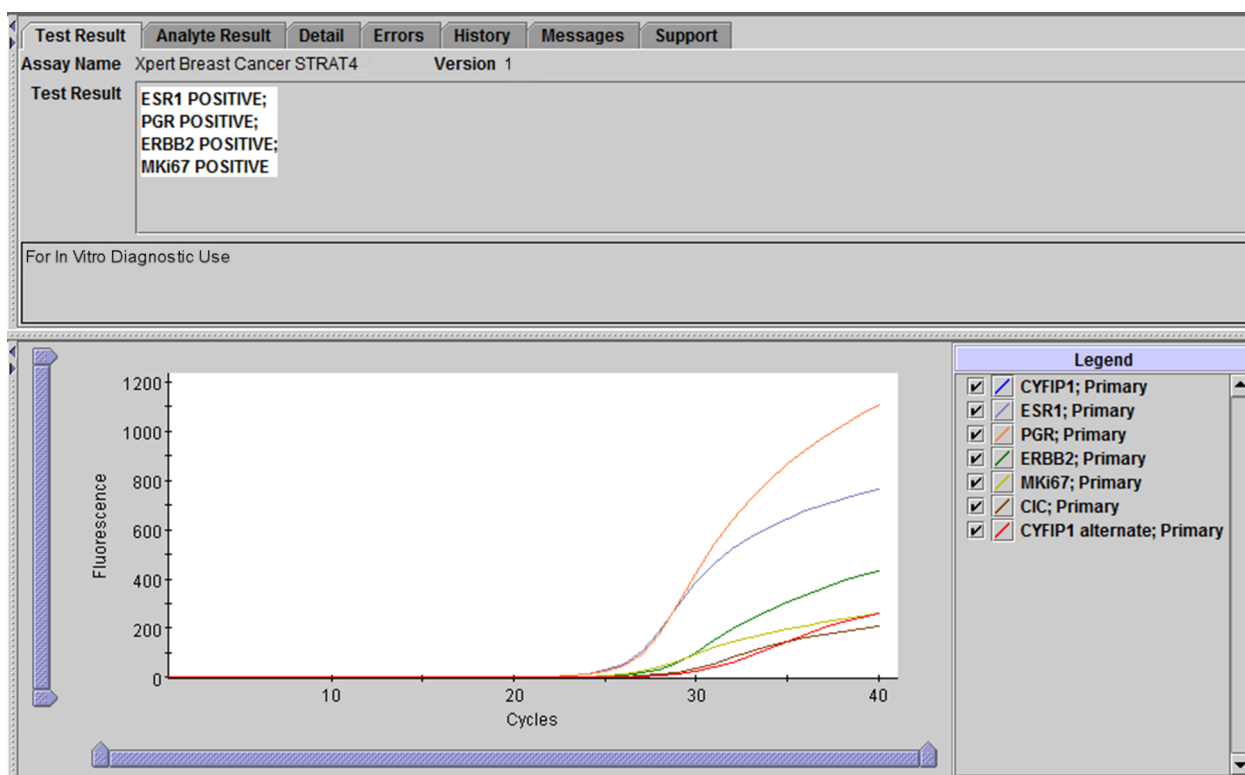
Zobrazený výsledek	CYFIP1	Alternativní CYFIP1	CIC
ESR1 POZITIVNÍ (<i>ESR1</i> POSITIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
ESR1 NEGATIVNÍ (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
PGR POZITIVNÍ (<i>PGR</i> POSITIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
PGR NEGATIVNÍ (<i>PGR</i> NEGATIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ	POZ nebo NEG
ERBB2 POZITIVNÍ (<i>ERBB2</i> POSITIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
ERBB2 NEGATIVNÍ (<i>ERBB2</i> NEGATIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
MKi67 POZITIVNÍ (<i>MKi67</i> POSITIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	POZ nebo NEG
MKi67 NEGATIVNÍ (<i>MKi67</i> NEGATIVE)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ	POZ nebo NEG
PGR NEURČITÝ (<i>PGR</i> INDETERMINATE)	ÚSPĚCH (PASS)	NEG	POZ nebo NEG
MKi67 NEURČITÝ (<i>MKi67</i> INDETERMINATE)	ÚSPĚCH (PASS)	NEG	POZ nebo NEG
ZOPAKUJTE TEST (REPEAT TEST)	ÚSPĚCH (PASS)	POZ nebo NEG	NEG
NEPLATNÝ (INVALID)	NEÚSPĚCH (FAIL)	NEG	POZ nebo NEG
CHYBA (ERROR)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)
ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)

Tabulka 2. Reprezentativní výsledky a interpretace testu Xpert Breast Cancer STRAT4

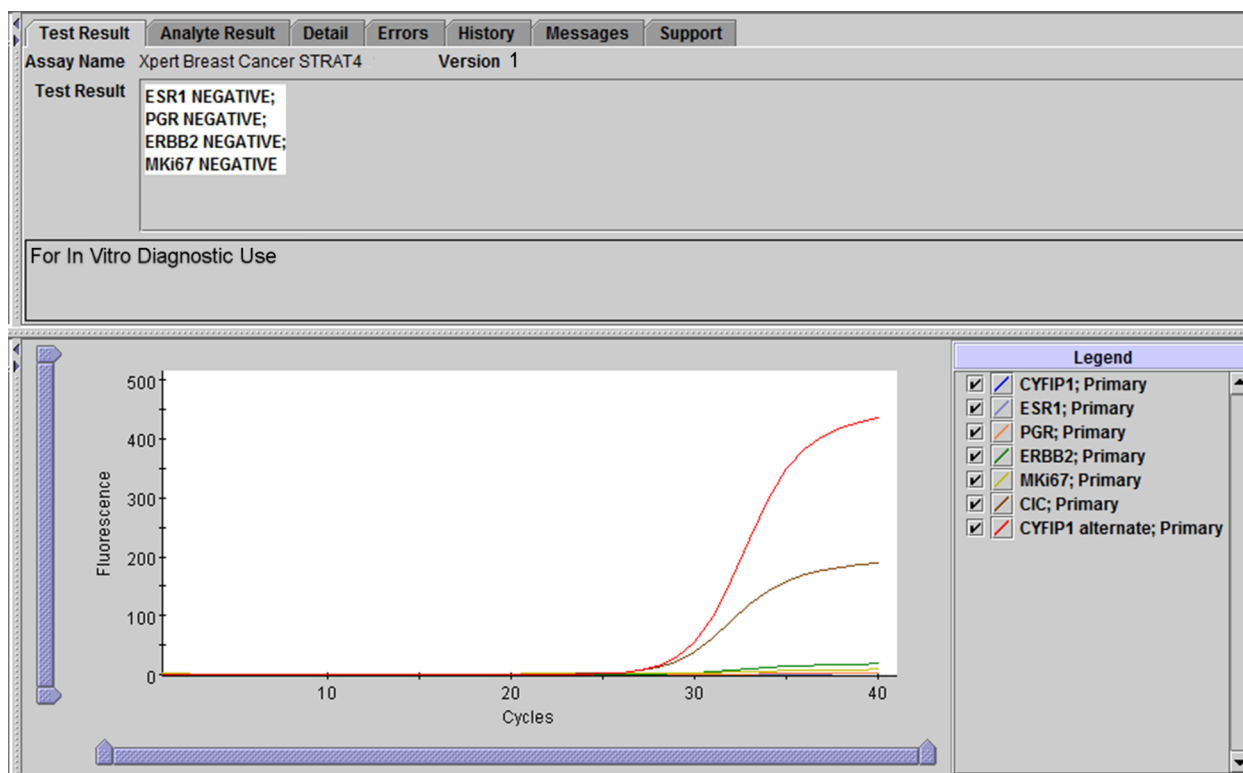
Výsledek	Interpretace
ESR1 POZITIVNÍ (ESR1 POSITIVE) Viz Obrázek 2.	• Transkript mRNA <i>ESR1</i> je nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) nad nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
PGR POZITIVNÍ (PGR POSITIVE) Viz Obrázek 2.	• Transkript mRNA <i>PGR</i> je nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) nad nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
ERBB2 POZITIVNÍ (ERBB2 POSITIVE) Viz Obrázek 2.	• Transkript mRNA <i>ERBB2</i> je nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) nad nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
MKi67 POZITIVNÍ (MKi67 POSITIVE) Viz Obrázek 2.	• Transkript mRNA <i>MKi67</i> je nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) nad nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
ESR1 NEGATIVNÍ (ESR1 NEGATIVE) Viz Obrázek 3.	• Transkript mRNA <i>ESR1</i> není nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) pod nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
PGR NEGATIVNÍ (PGR NEGATIVE) Viz Obrázek 3.	• Transkript mRNA <i>PGR</i> není nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) pod nastavenou hodnotou cut-off. • <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Alternativní <i>CYFIP1</i> – POZ; <i>CYFIP1</i> má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.

Výsledek	Interpretace
ERBB2 NEGATIVNÍ (ERBB2 NEGATIVE) Viz Obrázek 3.	- Transkript mRNA <i>ERBB2</i> není nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) pod nastavenou hodnotou cut-off. <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
MKi67 NEGATIVNÍ (MKi67 NEGATIVE) Viz Obrázek 3.	- Transkript mRNA <i>MKi67</i> není nadměrně exprimován a má hodnotu delta prahu cyklů (dCt) pod nastavenou hodnotou cut-off. <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Alternativní <i>CYFIP1</i> – POZ; <i>CYFIP1</i> má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
PGR neurčitý (PGR Indeterminate) Viz Obrázek 4.	- Hladinu exprese mRNA <i>PGR</i> nelze stanovit, protože vzorek neobsahuje dostatek materiálu. Zopakujte test s koncentrovanějším lyzátem. <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Alternativní <i>CYFIP1</i> – NEG; hodnota prahu cyklů (Ct) <i>CYFIP1</i> nebyla v platném rozsahu nebo koncový parametr byl pod nastavenou prahovou hodnotou, která je nutná pro zjištění stavu PGR. - Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
MKi67 neurčitý (MKi67 Indeterminate) Viz Obrázek 4.	- Hladinu exprese mRNA <i>MKi67</i> nelze stanovit, protože vzorek neobsahuje dostatek materiálu. Zopakujte test s koncentrovanějším lyzátem. <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Alternativní <i>CYFIP1</i> – NEG; hodnota prahu cyklů (Ct) <i>CYFIP1</i> nebyla v platném rozsahu nebo koncový parametr byl pod nastavenou prahovou hodnotou, která je nutná pro zjištění stavu MKi67. - Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
ZOPAKUJTE TEST (REPEAT TEST) Viz Obrázek 5.	- Hladiny exprese mRNA <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nelze stanovit. Zopakujte test s alikvotem uschovaného lyzátu vzorku FFPE. <i>CYFIP1</i> – ÚSPĚCH (PASS); transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován a má hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - Alternativní <i>CYFIP1</i> – POZ/NEG; transkript mRNA <i>CYFIP1</i> byl detekován. Transkript může, ale nemusí mít hodnotu prahu cyklů (Ct) v platném rozsahu a koncový parametr nad nastavenou prahovou hodnotou. - CIC – NEG; vnitřní kontrola má hodnotu prahu cyklů (Ct) mimo platný rozsah. - Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.

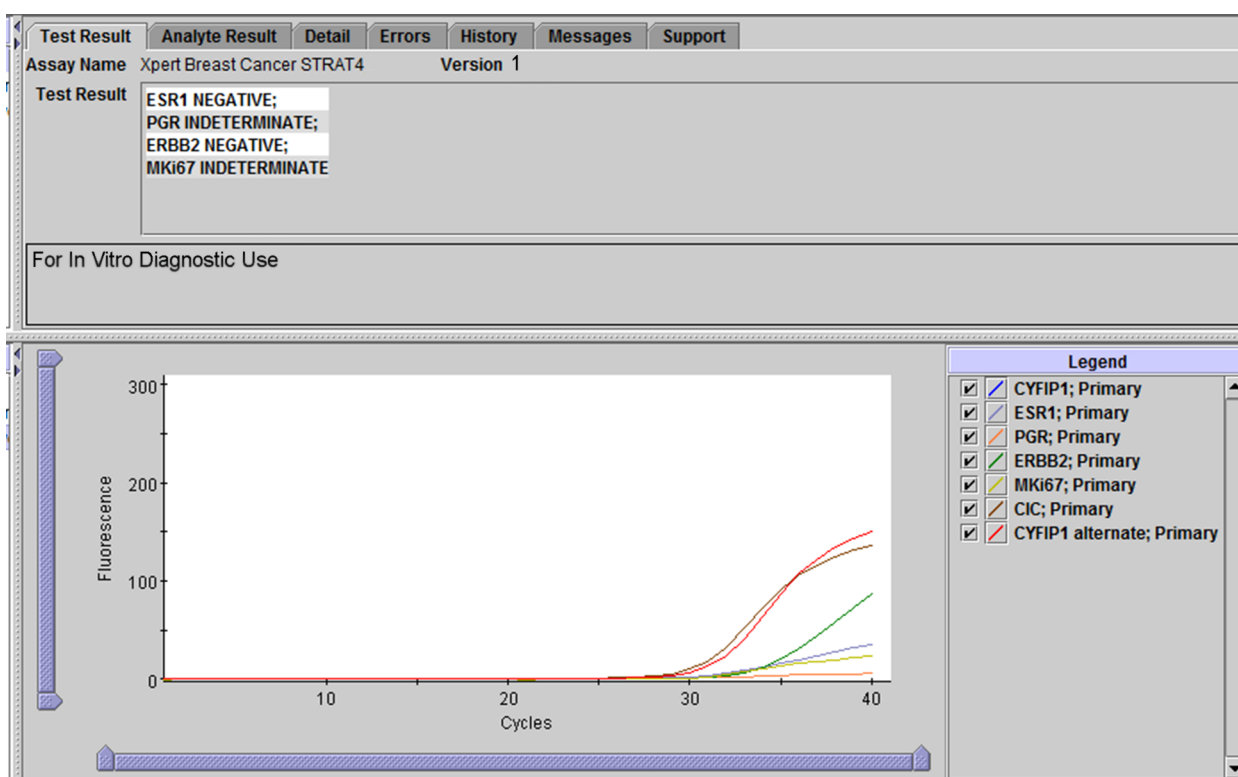
Výsledek	Interpretace
NEPLATNÝ (INVALID)	• NEPLATNÝ (INVALID) – Hladiny exprese mRNA <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nelze stanovit, protože vzorek neobsahuje dostatek materiálu. Zopakujte test s koncentrovanějším lyzátem. • <i>CYFIP1</i> – NEÚSPĚCH (FAIL); hodnota prahu cyklů (Ct) <i>CYFIP1</i> nebyla v platném rozsahu nebo koncový parametr byl pod nastavenou prahovou hodnotou. • Alternativní <i>CYFIP1</i> – NEG; hodnota prahu cyklů (Ct) <i>CYFIP1</i> nebyla v platném rozsahu nebo koncový parametr byl pod nastavenou prahovou hodnotou. • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS); všechny výsledky kontroly sondy byly úspěšné.
CHYBA (ERROR)	• Hladiny exprese mRNA <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nelze stanovit. Zopakujte test s alikvotem uschovaného lyzátu vzorku FFPE. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT) • Alternativní <i>CYFIP1</i> / <i>CYFIP1</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT) • Kontrola sondy – ÚSPĚŠNÁ (PASS)* / NEÚSPĚŠNÁ (FAIL); jeden nebo všechny výsledky kontroly sondy byly neúspěšné. * Pokud kontrola sondy proběhla úspěšně, je chyba způsobena maximálním limitem tlaku přesahujícím přijatelný rozsah, chybou proložení křivkou nebo selháním součásti systému.
ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)	• Hladiny exprese mRNA <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nelze stanovit. Nebylo shromážděno dostatečné množství dat k vyprodukování výsledku testu. To může nastat například tehdy, když operátor zastavil probíhající test. Zopakujte test s uschovaným lyzátem vzorku FFPE. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT) • Alternativní <i>CYFIP1</i> / <i>CYFIP1</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT) • Kontrola sondy – Neuplatňuje se (NA)



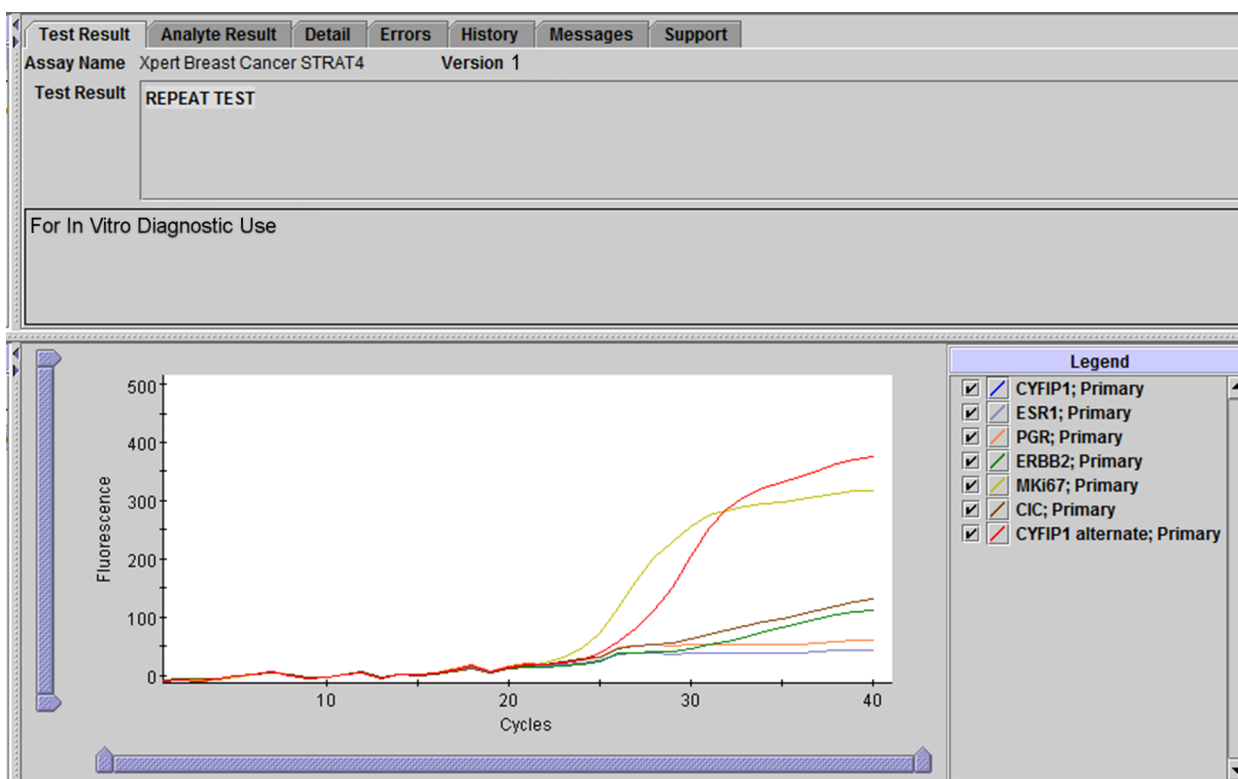
Obrázek 2. Okno zobrazení výsledků GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNÍ



Obrázek 3. Okno zobrazení výsledků GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNÍ



Obrázek 4. Okno zobrazení výsledků GeneXpert Dx: PGR/MKi67 NEURČITÝ



Obrázek 5. Okno zobrazení výsledků GeneXpert Dx: ZOPAKUJTE TEST (REPEAT TEST)

16 Důvody k opakování testu

Test opakujte s novou kazetou (kazetu nepoužívejte opakovaně).

- Výsledek **ZOPAKUJTE TEST (REPEAT TEST)** značí, že se nezdařila vnitřní kontrola. Vzorek nebyl správně zpracován. V tomto případě zopakujte test s novým alikvotem o objemu 520 µl ze stejného lyzátu FFPE.
- **NEPLATNÝ (INVALID)** výsledek značí, že se nezdařila referenční kontrola. Vzorek nebyl správně zpracován, PCR byla inhibována nebo byla kvalita RNA v dostupném nádoru nedostatečná. V tomto případě zopakujte test s koncentrovanějším lyzátem FFPE dle pokynů v návodu k použití lyzační soupravy FFPE.
- Výsledek **CHYBA (ERROR)** značí, že se nezdařila kontrola sond a test byl přerušen možná z důvodu nesprávně naplněné reakční zkumavky, z důvodu detekce problému s neporušeností sond, kvůli překročení maximálních limitů tlaku nebo byla detekována chyba umístění ventilu. V tomto případě zopakujte test s novým alikvotem o objemu 520 µl ze stejného lyzátu FFPE.
- **ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)** znamená, že nebylo shromážděno dostatečné množství údajů. Například obsluha zastavila probíhající test nebo došlo k výpadku napájení. V tomto případě zopakujte test s novým alikvotem o objemu 520 µl ze stejného lyzátu FFPE.
- Pokud externí kontrola kvality nefunguje podle očekávání, opakujte test externí kontroly a/nebo kontaktujte společnost Cepheid a požádejte o pomoc.

17 Omezení

- Úpravy těchto postupů mohou ovlivnit funkčnost testu. Výsledky testu Xpert Breast Cancer STRAT4 by měly být interpretovány společně s dalšími laboratorními a klinickými údaji, které má lékař k dispozici.
- Výkon testu Xpert Breast Cancer STRAT4 byl validován pomocí postupů uvedených v tomto návodu k použití a pomocí vzorků FFPE starých pět až deset let.
- Výkon testu Xpert Breast Cancer STRAT4 byl validován pouze pomocí postupů uvedených v tomto návodu k použití.
- Při nesprávném odběru, manipulaci nebo skladování vzorků či při jejich záměně může dojít k chybným výsledkům testu. Aby se zabránilo chybným výsledkům, je nutné pečlivě dodržovat pokyny v tomto návodu k použití.
- Funkční charakteristiky nebyly stanoveny pro pacienty mladší 25 let.
- Mutace nebo polymorfismy v oblastech primerů nebo oblastech vazby sond mohou vést k chybným, ale uvěřitelným výsledkům *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* a *MKi67*.

18 Funkční charakteristiky

18.1 Klinický výkon

Funkční charakteristiky testu Xpert Breast Cancer STRAT4 byly vyhodnoceny relativně k výsledkům IHC pro ER, PR, HER2 a Ki67 a k fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) pro amplifikaci genu HER2 na pracovištích v USA a EU. Původně bylo do této studie zařazeno celkem 211 zbylých deidentifikovaných vzorků FFPE primárních invazivních nádorů prsu z USA a EU. 10 vzorků bylo vyloučeno, protože nebyl k dispozici dostatek nádoru pro testování, a jeden vzorek byl vyloučen z důvodu odvolání souhlasu. Celkem tedy bylo k dispozici 200 vzorků pro zahrnutí do analýz dat. Pro každý vzorek FFPE bylo připraveno více sklíček pro testování Xpert, pro IHC testování ER, PR, HER2 a Ki67 a pro testování FISH amplifikace genu HER2.

Celkově poskytl test Xpert Breast Cancer STRAT4 platné výsledky při prvním pokusu testování pro 99,5 % (199/200) studovaných vzorků. Jeden vzorek, jehož výsledek byl zpočátku neurčitý (**CHYBA (ERROR)**, **NEPLATNÝ (INVALID)** nebo **ŽÁDNÝ VÝSLEDEK (NO RESULT)**), poskytl výsledek testu po jednom zopakování testu. Celková míra úspěšnosti testu byla 100,0 % (200/200).

Z 200 vzorků s platnými výsledky testu Xpert poskytly ESR1 a ERBB2 platný pozitivní nebo negativní výsledek testu ve 100 % případů (200/200). Pro PGR poskytl test Xpert platný pozitivní nebo negativní výsledek testu v 98,5 % případů (197/200) a pro MKi67 v 97,0 % (194/200) případů. 7 vzorků s neurčitými výsledky testu Xpert pro PGR a/nebo MKi67 bylo otestováno znovu pomocí metody koncentrovaného lyzátu FFPE. Původní výsledky (první pokus) a výsledky opakovaných testů uvádí Tabulka 3.

Pro celý soubor dat včetně výsledků opakovaných testů prokázal test Xpert Breast Cancer STRAT4 pozitivní procentuální shodu (PPA) 97,2 %, negativní procentuální shodu (NPA) 95,0 % a celkovou procentuální shodu (OPA) 97,0 % pro ESR1 relativně vůči IHC¹⁸ PPA 88,4 %, NPA 90,7 % a OPA 88,9 % pro PGR relativně vůči IHC¹⁸ PPA 100,0 %, NPA 92,4 % a OPA 93,3 % pro ERBB2 relativně vůči IHC¹⁹ a PPA 100 %, NPA 92,0 % a OPA 93,3 % pro ERBB2 relativně vůči

FISH HER2.¹⁹ Pro MKi67 byla PPA 88,8 %, NPA 100 % a OPA 90,7 % s prahovou hodnotou IHC nastavenou na > 20 % pro pozitivní a < 10 % pro negativní. Mezilehlé vzorky IHC MKi67 (prahová hodnota 10–20 % včetně) byly vyloučeny z analýzy. Celkové hodnoty PPA, NPA a OPA pro každý cíl uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3. Klinický výkon

Porovnání	Soubor dat ^a	Celkem (n) ^b	PPA	95% CI	NPA	95% CI	OPA	95% CI
ESR1/ER Xpert vs. IHC	Původní	199	97,2 % (174/179)	93,6–98,8	100 % (20/20)	83,9–100	97,5 % (194/199)	94,3–98,9
	Opakování testu	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 vs. IHC	Původní	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
	Opakování testu	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 vs. IHC	Původní	180	100 % (22/22)	85,1–100	92,4 % (146/158)	87,2–95,6	93,3 % (168/180)	88,7–96,1
	Opakování testu	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 vs. FISH	Původní	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1
	Opakování testu	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 vs. IHC + FISH	Původní	197	100 % (27/27)	87,5–100	91,2 % (155/170)	86,0–94,6	92,4 % (182/197)	87,8–95,3
	Opakování testu	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 vs. IHC	Původní	148	88,7 % (110/124)	81,9–93,2	100 % (24/24)	86,2–100	90,5 % (134/148)	84,7–94,3
	Opakování testu	151	88,8 % (111/125)	82,1–93,2	100 % (26/26)	87,1–100	90,7 % (137/151)	85,0–94,4

^a Původní = lyzát 1× dle pokynů v návodu k použití; opakování testu = výsledek opakování testu 4× zakoncentrovaného lyzátu v případech, kdy původní vzorek (lyzát 1×) poskytl neurčitý výsledek pro PGR a/nebo MKi67.

^b Vzorky s nejasnými nebo neurčitými výsledky Xpert, vzorky s nejednoznačnými nebo mezilehlými výsledky IHC, vzorky s nezdařilou IHC a nezdařilou FISH jsou vyloučeny.

19 Analytický výkon

19.1 Analytická citlivost / minimální vstup testu

Minimální vstup testu byl stanoven zhodnocením maximální hodnoty Ct CYFIP1 (referenčního genu), která přesně stanoví vstup vzorku potřebný pro robustní výkon testu. Tento vstup vzorku zajišťuje získání platných výsledků ve většině testovaných klinických vzorků FFPE. Vzorky s větší než dovolenou hodnotou Ct CYFIP1 vygenerují **NEPLATNÝ (INVALID)** výsledek.

Analytická citlivost / minimální vstup testu pro test Xpert Breast Cancer STRAT4 definované jako maximální hodnota Ct CYFIP1, která vede k ≥ 95 % platných výsledků, byly stanoveny ředěním lyzátů klinických vzorků FFPE s cílem otestovat hodnotu Ct CYFIP1. Pro zhodnocení citlivosti Ct CYFIP1 bylo připraveno sériové ředění lyzátu klinického vzorku FFPE, které bylo testováno s N = 20 replikátů v každé hladině ředění v průběhu 3 dnů, až dokud nebylo platných ≤ 95 % výsledků testu. Hladiny ředění zahrnovaly jeden vzorek na očekávaném minimálním vstupu testu, dvě hladiny nad touto hodnotou a dvě hladiny pod ní. Testování bylo provedeno na dvou šaržích kazet Xpert Breast Cancer STRAT4.

Před zahájením studie bylo provedeno testování meze blanku s N = 60 replikátů pomocí dvou nezávislých šarží kazet Xpert Breast Cancer STRAT4. Vzorek pro mez blanku byl tvořen prázdného parafinu (bez vzorku tkáně) a všechny výsledky testu vykazaly očekávané NEPLATNÉ (**NEPLATNÝ (INVALID)**) výsledky. Sériová ředění klinického vzorku tkáně FFPE se vstupem 1/1000 měla 20/20 platných hodnot Ct CYFIP1, kdy 1. šarže testu Xpert Breast Cancer STRAT4 měla průměrnou hodnotu Ct = 33,4 a SD 0,6 a 2. šarže průměrnou hodnotu Ct = 33,6 a SD 0,5. Další ředění s následnými

hodnotami Ct CYFIP1 nesplňovala požadavek ≥ 95 % platných výsledků vyžadovaný studií. Tabulka 4 shrnuje počet platných testovacích cyklů na každé sériově zředěné vstupní hladině vzorku vyjádřené ve formě relativního ředění nebo průměru Ct CYFIP1. Analytická citlivost za použití dvou šarží kazet testu Xpert Breast Cancer STRAT4 prokázala požadavek na minimální vstup testu pro CYFIP1 Ct = 33,4. Tato hodnota by společně s variabilitou testu umožňovala nastavit pro test Xpert Breast Cancer STRAT4 horní limit CYFIP1 Ct = 35.

Tabulka 4. Minimální vstup testu Xpert Breast Cancer STRAT4

Šarže soupravy	Vstup vzorku (relativní ředění)	Průměr Ct CYFIP1	SD	N platných cyklů (Ct ≤ 35)
00801 (šarže 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	Neuplatňuje se	Neuplatňuje se	0/20
00903 (šarže 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	Neuplatňuje se	Neuplatňuje se	0/20

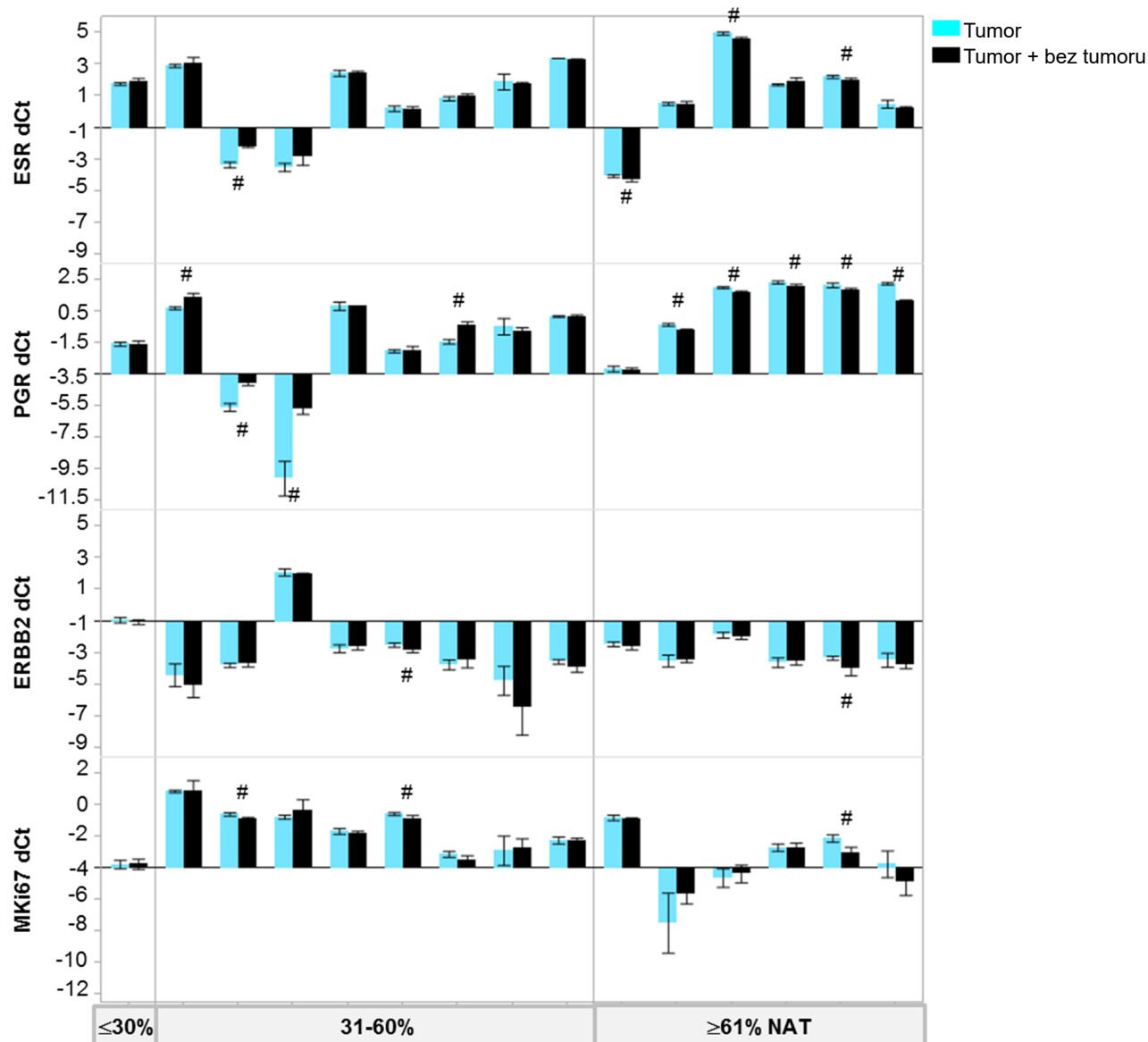
19.2 Testování interference

Přilehlá normální/nenádorová tkáň

Normální (nenádorové) přilehlé tkáně (NAT) se běžně vyskytují ve vzorcích tkáně rakoviny prsu jako kontaminanty, které mohou interferovat se specifickou detekcí cíle. Test Xpert Breast Cancer STRAT4 může dle rozhodnutí patologa v příslušných případech vyžadovat makrodisekci patologicky ověřeného řezu FFPE nádoru prsu za účelem snížení potenciálních vlivů nenádorových kontaminantů na minimum. Ke zhodnocení vlivu přilehlých normálních/nenádorových tkání bylo testem Xpert Breast Cancer STRAT4 otestováno patnáct (15) bloků tkáně FFPE s invazivním karcinomem prsu obsahujících 21–98 % okolní NAT, na kterých byla nebo nebyla provedena makrodisekce. Testování Xpert Breast Cancer STRAT4 bylo provedeno na N = 4 replikátech ze stejného lyzátu pro každý stav. Hodnoty dCt ESR1, PGR, ERBB2 a MKi67 pro každý vzorek tkáně s makrodisekci (modře ve sloupcovém grafu) nebo bez makrodisekce (černě ve sloupcovém grafu) byly nejprve vyhodnoceny jednofaktorovou analýzou ANOVA s cílem stanovit statistickou interferenci NAT. Za přítomnost klinicky významné interference NAT byl považován stav, kdy hodnota ddCt (delta-delta Ct) mezi vzorky s provedenou a neprovedenou makrodisekci byla $> 1,0$ a došlo ke změně výsledku testu. Výsledky studie shrnuje Obrázek 6.

Hodnoty dCt ESR1, PGR, ERBB2 a MKi67 všech 15 vzorků byly seskupeny na základě % NAT (≤ 30 %, 31–60 % nebo ≥ 61 %). Modré a černé svislé sloupcové grafy s SD představují průměrné hodnoty dCt cílů z N = 4 replikátů řezů FFPE s provedenou a neprovedenou makrodisekci z bloku FFPE invazivní rakoviny prsu. Všechny 15 bloků FFPE (N = 1 pod 30 % NAT, N = 8 s 31–60 % NAT a N = 6 nad 60 % NAT) nevykazovalo žádnou statisticky významnou interferenci přilehlé normální/nenádorové tkáně na základě jednoparametrových analýz ANOVA s p-hodnotou $\geq 0,05$ nebo nevykazovalo žádný klinický význam (označeno symbolem #), pokud odchylka v hodnotách delta Ct každého cíle mezi vzorky s provedenou a neprovedenou makrodisekci byla $\leq 1,0$ nebo pokud nebyly ovlivněny výsledky testu cíle (pozitivní, negativní).

Obrázek 6. Interference přilehlé normální/nenádorové tkáně s hodnotami dCt cílů testu Xpert Breast Cancer STRAT4



Tkáň DCIS, nekrotická tkáň, hemoragická tkáň

Zhodnocení vlivu tkáně duktálního karcinomu in situ (DCIS), nekrotické tkáně a hemoragické tkáně bylo provedeno testováním celkem 9 vzorků FFPE nádoru prsu (3 bloky FFPE nádoru prsu obsahující 3–61 % DCIS, 3 bloky FFPE obsahující 10–65 % nekrotické tkáně a 3 bloky FFPE obsahující 15–41 % hemoragické tkáně) s testem Xpert Breast Cancer STRAT4 s makrodisekcí a bez ní. Test Xpert Breast Cancer STRAT4 byl proveden na N = 4 replikátech ze stejného lyzátu pro každý stav. U všech testovaných stavů bylo zjištěno, že proměnlivé kontaminace tkání DCIS, nekrotickou tkání a hemoragickou tkání nemá při použití testu Xpert Breast Cancer STRAT4 žádný statisticky nebo klinicky významný vliv (grafická data nejsou znázorněna).

Lidská genomická DNA (hgDNA)

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 používá vysoce specifické primery a sondy k účinné hybridizaci s cílovými templáty mRNA ESR1, PGR, ERBB2 a MKI67 ze směsi genomických nukleových kyselin (lidská genomická DNA = hgDNA). Zhodnocení vlivu hgDNA na test Xpert Breast Cancer STRAT4 bylo provedeno makrodisekcí a testováním 10 bloků FFPE nádoru prsu s proměnlivým obsahem buněk invazivního duktálního karcinomu, kdy do lyzátního vzorku FFPE bylo nebo

nebylo přidáno 25 ng hgDNA. Testování bylo provedeno pomocí testu Xpert Breast Cancer STRAT4 na N = 4 replikátech ze stejného lyzátu pro každý stav. U všech testovaných stavů bylo zjištěno, že interference hgDNA nemá žádný statistický nebo klinický významný vliv (grafická data nejsou znázorněna).

19.3 Kontaminace z přenosu

Byla provedena studie, jejímž účelem bylo prokázat, že jednorázové soběstačné kazety GeneXpert minimalizují kontaminaci negativních vzorků přenosem z velmi vysoce pozitivních vzorků analyzovaných bezprostředně před negativními vzorky ve stejném modulu GeneXpert. Studie obsahovala negativní vzorek zpracovaný ve stejném modulu GeneXpert bezprostředně po vysoce ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 pozitivním vzorku. Negativní vzorek byl tvořen *in vitro* transkribovanou (IVT) RNA obsahující 5×10^4 kopií transkriptu CYFIP1, aby byla zajištěna přítomnost cílového referenčního genu. Vysoce pozitivní vzorek byl připraven jako lyzát FFPE a byl tvořen IVT RNA obsahující 5×10^5 kopií transkriptu CYFIP1 a IVT RNA obsahující 5×10^6 kopií transkriptů ESR1, PGR, ERBB2 a MKi67. Schéma testování bylo zopakováno 41krát s použitím jednoho modulu GeneXpert pro celkem 20 vysoce pozitivních a 21 negativních vzorků. Všechny 20 vysoce pozitivních vzorků bylo správně ohlášeno jako ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNÍ (POSITIVE) a všech 21 negativních vzorků bylo správně ohlášeno jako ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNÍ (NEGATIVE).

19.4 Reprodukovatelnost a preciznost testu

Reprodukovatelnost testu Xpert Breast Cancer STRAT4 byla vyhodnocena použitím panelu pěti vzorků lyzátů.

Tři členy panelu byly připraveny přidáním *in vitro* transkriptu (IVT) RNA do lyzačního pufru FFPE obohaceného na hodnotu do ~2dCt od hodnoty cut-off dCt pro ESR1 (1 IVT RNA), PGR (2 IVT RNA) a ERBB2 (3 IVT RNA) a s hodnotami Ct CYFIP1 ~2–3 Ct od hladiny minimálního vstupu testu.

Dva členy panelu (klinický vzorek FFPE č. 4 a klinický vzorek FFPE č. 5) byly vytvořeny ze smíchaných klinických vzorků FFPE v lyzačním pufru FFPE tak, aby měly hodnoty Ct CYFIP1 blízko minimálního vstupu testu a aby měly hodnoty cut-off dCt pro všechny cíle napříč vykazovatelným rozsahem a co možná nejblíže hodnotám cut-off dCt testu.

Dva operátoři na každém ze tří studijních pracovišť testovali každý den dva panely po pěti vzorcích po dobu šesti testovacích dnů (pět vzorků $\times$ šest dnů $\times$ dva operátoři $\times$ dva replikáty $\times$ tři pracoviště). Celkem bylo otestováno 72 replikátů každého vzorku. Na každém ze tří testovacích pracovišť byly použity tři šarže kazet Xpert Breast Cancer STRAT4. Test Xpert Breast Cancer STRAT4 byl proveden podle postupu v tomto návodu k použití.

Reprodukovatelnost testu Xpert Breast Cancer STRAT4 byla vyhodnocena dle dCt pro každý ze čtyř cílů pro každý panel. Průměr, směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV) mezi pracovišti, mezi šaržemi, mezi dny, mezi operátory a v rámci testů pro každý člen panelu uvádí Tabulka 5.

Tabulka 5. Souhrn údajů o reprodukovatelnosti

Vzorek	Kanalál stanovení (analyt)	N ^a	Průměr dCt	Mezi pracovišti		Mezi šaržemi		Mezi dny		Mezi operátory		V rámci stanovení		Celkem	
				Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)
1-IVT RNA	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-IVT RNA	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-IVT RNA	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
Klinický vzorek 4-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

Vzorek	Kanál stanovení (analyt)	N ^a	Průměr dCt	Mezi pracovišti		Mezi šaržemi		Mezi dny		Mezi operátory		V rámci stanovení		Celkem	
				Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)	Odch.	CV (%)
	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
Klinický vzorek 5-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 Výsledky s platnými hodnotami delta Ct ze 72

20 Literatura

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
3. American Cancer Society, Breast Cancer Facts and Figures 2013-2014, Atlanta, GA: American Cancer Society, 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, Tschaller 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, Karaïskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakis M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. Oncology. 2013;84:219-225.
10. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle 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, Trufelli 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. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 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 Ústřední sklad společnosti Cepheid

Podniková centrála

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Evropská centrála

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Technická pomoc

Dříve, než kontaktujete technickou podporu společnosti Cepheid, připravte si následující informace:

- Název produktu
- Číslo šarže
- Sériové číslo přístroje
- Chybové zprávy (pokud je to relevantní)
- Verze softwaru a (pokud je to relevantní) číslo servisního štítku počítače

Spojené státy

Telefon: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

Francie

Telefon: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

Kontaktní informace všech kanceláří technické podpory společnosti Cepheid jsou uvedeny na našem webu:
www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Tabulka značek

Značka	Význam
	Katalogové číslo
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Označení CE – Evropská shoda
	Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství
	Nepoužívat opětovně
	Kód šarže
	Čtěte návod k použití
	Upozornění
	Výrobce
	Země výroby
	Obsahuje dostatečné množství pro <i>n</i> testů
	Kontrola
	Datum expirace
	Teplotní limit
	Biologická rizika
	Zplnomocněný zástupce ve Švýcarsku
	Dovozce



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 Historie revizí

Část	Popis změny
V celém dokumentu	Odstraněny všechny odkazy na software ONCore.