GeneXpert
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert® Breast Cancer STRAT4

REF **GXBCSTRAT4-CE-10**

Mode d’emploi

CE IVD

Cepheid

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

301-4981-FR, Rév. F
2025-03

Déclarations sur les marques de commerce, les brevets et le droit d’auteur

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®, le logo Cepheid, GeneXpert® et Xpert® sont des marques de commerce de Cepheid enregistrées aux États-Unis et dans d’autres pays.

Toutes les autres marques commerciales sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

L’ACHAT DE CE PRODUIT CONCÈDE À L’ACHETEUR LE DROIT NON TRANSFÉRABLE DE L’UTILISER CONFORMÉMENT À CETTE NOTICE D’UTILISATION. AUCUN AUTRE DROIT N’EST CONCÉDÉ QUE CE SOIT EXPRESSÉMENT, DE FAÇON IMPLICITE OU PAR PRÉCLUSION. DE PLUS, AUCUN DROIT DE REVENTE N’EST CONCÉDÉ AVEC L’ACHAT DE CE PRODUIT.

© 2017—2025 Cepheid.

Consulter l’Historique des révisions pour une liste détaillée des modifications.

Xpert® Breast Cancer STRAT4

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

1 Nom de marque déposée

Xpert® Breast Cancer STRAT4

2 Nom commun ou usuel

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Utilisation prévue

Xpert Breast Cancer STRAT4 est un test semi-quantitatif basé sur la réaction de polymérisation en chaîne avec les valeurs seuil qualitatives des ARNm pour le récepteur des œstrogènes (*ESR1*), le récepteur de la progestérone (*PGR*), le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (*ERBB2/HER2*) et le marqueur de prolifération Ki-67 (*MKi67*) isolés du tissu d'un cancer invasif du sein, fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'ARN est extrait d'une région enrichie en tumeur d'une coupe de tissu microscopique tel qu'identifié par un anatomopathologiste. Le test est prévu pour être utilisé conjointement à d'autres données cliniques et d'analyse dans la classification des tissus du cancer du sein selon le statut des récepteurs hormonaux, le statut du récepteur HER2 et le statut des marqueurs de prolifération. Le test est destiné à être utilisé avec le système GeneXpert®, qui inclut l'isolement de l'ARN du tissu FFPE ainsi que l'amplification et la détection des séquences cibles à l'intérieur de la cartouche.

Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 n'est pas destiné à être utilisé comme :

- Un prédicteur de la sévérité de la maladie
- Un dispositif autonome pour les tests diagnostiques du cancer du sein
- Un dispositif d'aide au pronostic de maladie récurrente

Indications d'emploi : Le test est destiné à être utilisé dans l'évaluation des niveaux d'ARNm d'*ESR1*, *PGR*, *ERBB2* et *MKi67* dans les tissus de cancer du sein invasif provenant de patientes et préparés sous forme d'échantillons FFPE, et pour faciliter l'évaluation clinique conjointement à d'autres données d'analyse.

4 Synthèse et description

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus courants chez les femmes à l'échelle mondiale, avec environ 1,7 millions de nouveaux cas tous les ans.[1] En Europe environ 494 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année et 143 000 patientes mourront de leur maladie. Aux États-Unis, environ 200 000 nouveaux cas de cancer du sein invasif ont été diagnostiqués en 2015.[2] Le cancer du sein est la cause la plus répandue de mortalité due au cancer parmi les femmes dans les pays en développement et la deuxième cause la plus répandue de mortalité due au cancer (après le cancer du poumon) chez les femmes dans les pays développés.[2]

Chez les femmes, le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la principale cause de décès par cancer.[1] La mortalité due au cancer du sein a diminué de 34 pour cent depuis 1990 en grande partie à cause des traitements améliorés et de la détection précoce.[3] Les mesures de l'expression des protéines ER et PR sont pronostiques de l'issue du cancer du sein, et prédisent la réponse au tamoxifène et à d'autres hormonothérapies. [4,5,6,7] La surexpression de HER2 évoque un pronostic négatif chez les femmes atteintes de cancer du sein, mais surtout, la réponse au trastuzumab ou à d'autres traitements ciblant HER2 est prédite par la surexpression de la protéine HER2 (ERBB2) ou l'amplification du gène HER2.[8] Le marqueur de prolifération Ki-67 (MKi67) a été largement étudié dans des études rétrospectives sur les patients

atteintes de cancer du sein[9] et est considéré comme un indicateur important de la nécessité d'une chimiothérapie.[10] Les méta-analyses ont montré qu'il est associé à de moins bons résultats de survie dans le cancer du sein au stade précoce.[11] Étant donné leur importance dans le choix d'un schéma thérapeutique efficace pour une patiente atteinte de cancer du sein, les directives de traitement de la Société européenne d'Oncologie médicale (ESMO) recommandent que tous les carcinomes du sein primaires soient testés pour ER, PR, HER2 (ERBB2) et Ki67 au moment du diagnostic.[12]

L'immunohistochimie (IHC) est utilisée couramment pour la mesure de l'expression des protéines ER, PR, HER2 et Ki67. Pour l'expression de HER2, l'IHC est en général le premier test réalisé et les résultats sont rapportés sur une échelle de 0 à 3+. Si le résultat pour l'expression de HER2 est équivoque (2+), l'échantillon est retransmis pour un test par hybridation in situ (ISH) de HER2, comme l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) ou l'hybridation in situ chromogénique (CISH) qui cherche l'amplification du gène HER2.[13] Un haut degré de variabilité des résultats a été montré pour l'IHC et l'ISH lors de comparaisons entre les laboratoires, dû en grande partie aux différences dans les anticorps utilisés pour l'IHC ainsi qu'à la subjectivité des méthodes d'interprétation.[14]

Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 est un test de diagnostic in vitro pour déterminer les niveaux de surexpression des ARNm d'*ESR1*, *PGR*, *ERBB2* et *MKi67* isolés d'échantillons FFPE du tissu d'un cancer du sein invasif.

Le test est réalisé dans une cartouche autonome après une courte étape de préparation externe du lysat d'échantillon, et exige moins de 15 minutes de manipulation avec un temps de rendu du résultat total de moins de 2 heures.

5 Principe de la procédure

Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 est un test en temps réel basé sur la réaction de polymérisation en chaîne après (PCR) pour la détection des ARNm d'ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67 isolés du tissu d'un cancer invasif du sein fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE). Le test est réalisé sur les systèmes GeneXpert de Cepheid. Les systèmes GeneXpert automatisent et intègrent la purification des échantillons, l'amplification de l'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes en utilisant des tests RT-PCR en temps réel. Les systèmes comportent un instrument, un lecteur de code-barres, un ordinateur et un logiciel préchargé pour l'exécution des tests et l'affichage des résultats. Les systèmes utilisent des cartouches GeneXpert jetables à usage unique qui contiennent les réactifs RT-PCR et hébergent le processus RT-PCR. Pour obtenir une description complète des systèmes, consulter le manuel d'utilisation du système GeneXpert approprié.

Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 inclut les réactifs pour la détection simultanée de ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67, un gène de référence CYFIP1 (protéine 1 entrant en interaction avec FMR1 cytoplasmique), un contrôle interne RT-PCR (CIC) et un contrôle de vérification des sondes (CVS) interne. Le gène de référence vérifie l'adéquation de l'échantillon et est utilisé pour normaliser les niveaux d'expression de l'ARNm pour ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67. Le contrôle interne RT-PCR (CIC) est utilisé pour vérifier que la réaction RT-PCR s'est correctement déroulée. Le CVS confirme la réhydratation des billes de réactifs, le remplissage des tubes de RT-PCR, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome dans la cartouche. Au total, le test utilise six canaux fluorescents distincts pour la détection de la cible ou du contrôle/référence avec ces propres paramètres de seuils pour la validité de la cible/contrôle/référence.

Les échantillons FFPE doivent être traités d'abord avec le Xpert® FFPE Lysis Kit en préparant une coupe de tissu de 4 à 5 µm (micron) d'épaisseur dans laquelle le tissu FFPE est d'abord macrodisséqué, si nécessaire, afin d'enrichir la région tumorale invasive, puis gratté et placé dans un tube avec les volumes recommandés de réactif de lyse FFPE et de protéinase K. La solution est incubée ensuite dans une enceinte chauffante à 80 °C pendant 30 minutes. De l'éthanol est mélangé ensuite avec l'échantillon et le volume recommandé de lysat d'échantillon préparé est ajouté ensuite directement à une cartouche de test. La cartouche de test est insérée dans un module du système GeneXpert où la purification de l'acide nucléique, l'amplification et la détection en temps réel sont toutes entièrement automatisées et complètement intégrées par le système. Tous les réactifs nécessaires à la préparation intégrée de l'échantillon et à l'analyse RT-PCR sont préchargés dans la cartouche. Les acides nucléiques dans le lysat sont capturés sur un filtre, lavés et élués par sonication. L'acide nucléique purifié est mélangé avec les réactifs RT-PCR secs, et la solution est transférée dans le tube réactionnel pour la RT-PCR et la détection. Le délai d'obtention du résultat est d'environ 75 minutes dans le GeneXpert.

Les valeurs seuil de détection utilisées par le test Xpert Breast Cancer STRAT4 dans chaque canal fluorescent ont été établies pour maximiser le pourcentage de concordance positive, négative et globale par rapport aux résultats de l'IHC ou de l'IHC/FISH du laboratoire de référence pour chaque cible. Le test IHC pour ER, PR, Ki67 et HER2 et le test FISH pour HER2 ont été effectués et des scores ont été attribués conformément aux instructions du mode d'emploi. L'interprétation des résultats a été réalisée conformément aux directives ASCO/CAP 2013 .[15] Les tumeurs ont été classées comme ER positives ou PRIHC positives lorsque ≥1 % des cellules tumorales invasives ont montré une coloration nucléaire nette, indépendamment de l'intensité de la coloration. L'expression de HER2 a été évaluée avec le kit HercepTest (IHC) (Dako) et un score de 0, 1+, 2+ ou 3+ a été attribué. Les tumeurs ayant reçu un score de 2+ ont été testées automatiquement avec le test FISH pour HER2 en utilisant le PathVysion HER2 DNA Probe Kit (Vysis-Abbott, Chicago, IL, États-Unis). Les cas ont été considérés comme étant HER2 positifs dans les situations suivantes : un score de 3+ avec le test IHC et/ou amplification par FISH (définition : HER2:CEP17 (rapport ≥2,0)), et/ou un nombre moyen de copies de HER2 ≥ 6,0 signaux/cellule,

conformément à la mise à jour des directives de pratique clinique ASCO/CAP pour les tests HER2 dans le cancer du sein (2013 ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update for HER2 Testing in Breast Cancer).[15] Pour le MKi67, les tumeurs ont été classées comme positives (élevées), lorsque ≥20 % des cellules tumorales invasives ont montré une coloration nucléaire nette, indépendamment de l'intensité de la coloration.

Dans le cas du gène de référence de contrôle et du contrôle RT-PCR interne, les seuils de détection définissent les plages des valeurs minimum et maximum de cycle seuil (Ct) de la PCR qui déterminent un résultat valide, une quantité d'échantillon minimum adéquate et l'absence d'inhibition de la PCR. Dans le cas des cibles ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67, les seuils de détection sont définis par des valeurs de la différence de cycles seuil (dCt) (Ct gène de référence moins Ct gène cible) qui déterminent les résultats « POSITIF (POSITIVE) » vs « NÉGATIF (NEGATIVE) » pour une cible donnée dans un canal.

6 Réactifs et instruments

6.1 Matériel fourni

Le kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons de contrôle qualité ou lysats FFPE préparés avec le Xpert FFPE Lysis Kit (n° de référence GXFFPE-LYSIS-CE-10). Le kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contient les éléments suivants :

Cartouches Xpert Breast Cancer STRAT4 avec tubes réactionnels intégrés	**10**
● Billes 1, 2 et 3 (lyophilisées)	1 par cartouche
● Réactif de rinçage,	1,0 ml par cartouche
● Réactif d'élution,	2,0 ml par cartouche
CD	**1 par kit**
● Fichier de définition du test (Assay Definition File, ADF) ● Notice d'utilisation	

Remarque Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com sous l'onglet **ASSISTANCE (SUPPORT)**.

Remarque La sérum-albumine bovine (bovine serum albumin, BSA) des billes de ce produit a été produite et fabriquée exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. Les animaux n'ont pas été alimentés par des protéines de ruminant ou d'autres protéines animales ; ils ont subi avec succès les analyses ante- et post-mortem. Pendant la fabrication, le produit n'a été mélangé à aucun autre produit d'origine animale.

7 Conservation et manipulation

- Conserver le contenu du kit Xpert Breast Cancer STRAT4 à une température comprise entre 2 °C et 28 °C.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche avant d'être prêt à réaliser le test.
- Utiliser la cartouche dans les 30 minutes suivant l'ouverture du couvercle.
- Ne pas utiliser une cartouche qui a fui.

8 Matériel requis mais non fourni

- Xpert FFPE Lysis Kit (n° de référence GXFFPE-LYSIS-CE-10) pour la préparation du lysat FFPE. Ce kit se compose de réactif de lyse FFPE, de protéinase K (PK), de tubes de 1,5 ml et de flacons de 5 ml.
- Agitateur à Vortex.
- Pipettes et embouts de pipette à filtre anti-aérosol capables de pipeter 600 µL 1,2 µL et 520 µL.
- Ordinateur avec logiciel exclusif GeneXpert version 4.7b ou ultérieure, Xpertise version 6.4b ou ultérieure, lecteur de code-barres et manuel d'utilisation du système GeneXpert approprié.
- Imprimante : Si une imprimante est requise, contacter le service du support technique de Cepheid pour organiser l'achat d'une imprimante recommandée.

9 Avertissements et mises en garde

- Réservé à un usage de diagnostic *in vitro*.
- Tous les échantillons biologiques doivent être traités comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Tous les échantillons humains doivent être traités en utilisant les précautions habituelles. Les directives pour la manipulation des échantillons sont disponibles auprès de l'Organisation mondiale de la santé ou des centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention).
- Respecter les procédures de sécurité de l'établissement pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Les caractéristiques des performances de ce test ont été établies uniquement avec le type d'échantillon indiqué dans la section Section 3. La performance de ce test n'a pas été évaluée sur d'autres types de spécimens ou d'échantillons.
- Le tissu FFPE doit être traité avec le Xpert FFPE Lysis Kit (n° de référence GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Le retrait (grattage) incomplet de la région tumorale de la lame pour la préparation du lysat FFPE peut entraîner une quantité de matériel insuffisante pour le test et donc un taux de résultats indéterminés/non valides (invalid) plus élevé que prévu avec le test Xpert Breast Cancer STRAT4.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche Xpert Breast Cancer STRAT4 sauf pour ajouter le lysat FFPE préparé.
- Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée après l'avoir retirée de son emballage.
- Ne pas agiter la cartouche. L'agitation ou la chute de la cartouche après l'ouverture de son couvercle peut conduire à des résultats non valides.
- Ne pas utiliser une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.
- Chaque cartouche Xpert Breast Cancer STRAT4 à usage unique est utilisée pour effectuer un seul test. Ne pas réutiliser des cartouches usagées.
- Ne pas utiliser une cartouche si elle semble humide ou si son couvercle semble avoir été descellé.
- Ne pas placer l'étiquette du n° Id de l'échantillon sur le couvercle de la cartouche ou sur l'étiquette à code-barres.
- Il est recommandé de respecter les bonnes pratiques de laboratoire et de changer de gants après la manipulation de chaque échantillon de patient pour éviter la contamination des échantillons ou des réactifs.
- Consulter le personnel chargé des déchets environnementaux auprès de l'établissement pour les consignes concernant l'élimination correcte des cartouches usagées et des réactifs inutilisés. Vérifier les réglementations locales et régionales car elles risquent d'être différentes des réglementations nationales d'élimination. La substance peut présenter les caractéristiques d'un déchet dangereux nécessitant des conditions d'élimination spécifiques. Les établissements doivent vérifier leurs exigences en matière d'élimination des déchets dangereux.

10 Risques chimiques[16,17]

Selon le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage (SGH), ce matériau n'est pas considéré dangereux.

11 Prélèvement, transport et conservation des échantillons

- Utiliser uniquement avec des échantillons FFPE traités avec le Xpert FFPE Lysis Kit (n° de référence GXFFPE-LYSIS-CE-10). Observer les directives ASCO/CAP[15] pour la préparation du tissu FFPE.
- Préparer le lysat FFPE à partir d'un bloc de tumeur FFPE ayant la plus grande région de carcinome mammaire approprié (cellularité tumorale de 30 % au minimum) et réaliser une macrodissection manuelle, si nécessaire, avant de procéder au test Xpert Breast Cancer STRAT4. Pour les échantillons tumoraux de moins de 10 mm^2 contenant moins de 30 % de tumeur, l'utilisation d'une procédure de lysat concentré ou de plus d'une coupe de 4 à 5 µm peut être nécessaire pour obtenir des résultats valides.
- Le lysat FFPE doit être transporté au laboratoire à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
- Le lysat FFPE est stable pendant jusqu'à 1 semaine entre 2 °C et 8 °C ou pendant 4 semaines à ≤ -20 ºC avant la réalisation du test Xpert Breast Cancer STRAT4. Pour la conservation à long terme, conserver à -80 ºC. Plus d'un cycle de congélation/décongélation est déconseillé. Lors de la décongélation, ramener à température ambiante et mélanger le lysat FFPE au vortex pendant 15 secondes avant l'emploi.

12 Procédure

Important **L'utilisation de la cartouche Xpert Breast Cancer STRAT4 nécessite la préparation d'un lysat utilisant le Xpert FFPE Lysis Kit (n° de référence GXFFPE-LYSIS-CE-10).**

Important **Démarrer le test dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de l'échantillon préparé à la cartouche.**

12.1 Préparation du lysat FFPE

Préparer le lysat FFPE conformément au mode d'emploi du FFPE Lysis Kit.

12.2 Préparation de la cartouche

1. Sortir la cartouche de l'emballage en carton.
2. Mélanger le lysat FFPE préparé au vortex pendant 15 secondes avant l'emploi.
3. Ouvrir le couvercle de la cartouche.
4. À l'aide d'une pipette, transférer 520 µl de lysat FFPE dans la chambre échantillon de la cartouche. (Remarque : une petite quantité de précipité peut être présente, mais n'affecte pas les performances du test).

   Conserver le lysat FFPE restant entre 2 °C et 8 °C ou à ≤–20 °C en cas de répétition du test.

Figure 1. Cartouche Xpert Breast Cancer STRAT4 (vue de dessus)

5. Fermer le couvercle de la cartouche. S'assurer que le couvercle s'enclenche fermement en place.

12.3 Démarrage du test

Important **Avant de démarrer le test, s'assurer que le fichier de définition du test (Assay Definition File, ADF) Xpert Breast Cancer STRAT4 est importé dans le logiciel.**

Cette section indique les étapes par défaut pour utiliser le système GeneXpert. Pour des instructions détaillées, consulter le *Manuel d'utilisation du système GeneXpert Dx* ou le *Manuel d'utilisation du système GeneXpert Infinity*, selon l'instrument utilisé.

Remarque Les étapes à suivre peuvent être différentes si l'administrateur du système a modifié le schéma opérationnel par défaut du système.

1. Mettre l'instrument GeneXpert sous tension :
   - Si l'instrument GeneXpert Dx est utilisé, commencer par mettre l'instrument GeneXpert Dx sous tension, puis allumer l'ordinateur. Le logiciel GeneXpert se lancera automatiquement ou nécessitera un double-clic sur l'icône du logiciel GeneXpert Dx sur le bureau Windows®.

     ou
   - Si l'instrument GeneXpert Infinity est utilisé, allumer l'instrument. Le logiciel Xpertise se lancera automatiquement ou peut nécessiter un double-clic sur l'icône du logiciel Xpertise sur le bureau Windows.
2. Se connecter au logiciel du système GeneXpert en saisissant le nom d'utilisateur et le mot de passe. Dans la fenêtre Système GeneXpert (GeneXpert System), cliquer sur **Create Test (Créer un test)** (GeneXpert Dx) ou cliquer sur **Orders (Commandes)** et **Order Test (Commander un test)** (Infinity). La fenêtre Create Test (Créer un test) s'ouvre.

3. Lire ou saisir le n° Id de l'échantillon (Sample ID). S'assurer, le cas échéant, de saisir correctement le N° Id de l'échantillon (Sample ID). Le N° Id de l'échantillon (Sample ID) est associé aux résultats du test et il est indiqué dans la fenêtre Afficher les résultats (View Results) ainsi que dans tous les rapports. La boîte de dialogue Lire le code-barres de la cartouche (Scan Cartridge Barcode) s'affiche.
4. Lire le code-barres sur la cartouche Xpert Breast Cancer STRAT4. La fenêtre Créer un test (Create Test) s'affiche. Grâce aux informations du code-barres, le logiciel remplit automatiquement les cases des champs suivants : Sélectionner un test (Select Assay), N° du lot (Reagent Lot ID), N° de série de cartouche (Cartridge SN).
5. Cliquer sur **Start Test (Démarrer le test)** (GeneXpert Dx) ou **Submit (Soumettre)** (Infinity). Saisir le mot de passe s'il est demandé.
6. Pour l'instrument GeneXpert Dx :
   a) Ouvrir la porte du module de l'instrument avec le voyant vert clignotant et charger la cartouche.
   b) Fermer la porte. Le test démarre et le voyant vert arrête de clignoter. Lorsque le test est terminé, le voyant s'éteint.
   c) Attendre que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir. Retirer la cartouche.
   d) Éliminer les cartouches usagées dans un conteneur à déchets pour échantillons approprié, conformément aux pratiques standard de l'établissement. Voir Section 9.

   ou

   Pour le système GeneXpert Infinity, placer la cartouche sur le tapis roulant. La cartouche sera automatiquement chargée, le test sera exécuté et la cartouche usagée sera placée dans le conteneur à déchets.

13 Affichage et impression des résultats

Cette section énumère les étapes de base pour l'affichage et l'impression des résultats. Pour des instructions plus détaillées sur l'affichage et l'impression des résultats, consulter le *Manuel d'utilisation du système GeneXpert Dx* ou le *Manuel d'utilisation du système GeneXpert Infinity*, selon l'instrument utilisé.

1. Cliquer sur l'icône **View Results (Afficher les résultats)** pour afficher les résultats.
2. Une fois le test terminé, cliquer sur le bouton **Rapport (Report)** de la fenêtre Afficher les résultats (View Results) pour afficher et/ou créer un fichier de rapport au format pdf.

14 Contrôle qualité

Chaque test contient un gène de référence de contrôle (*CYFIP1*) et un contrôle de vérification des sondes (CVS).

- **Contrôle *CYFIP1*** : Ce gène de référence est utilisé pour normaliser les niveaux d'expression pour les récepteurs *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, et *MKi67*. Il sert également de contrôle d'adéquation de l'échantillon (CAE) assurant que l'échantillon contient une quantité suffisante d'ARN. Un signal *CYFIP1* minime est requis pour que le résultat du test soit valide. Un signal *CYFIP1* en dessous de la quantité minimum ou un signal négatif indique que l'échantillon ne contient pas une quantité suffisante d'ARN.
- ***CYFIP1* alternatif** : Il s'agit d'un double du contrôle *CYFIP1* utilisé dans l'algorithme quand la différence de cycles seuil (dCt) de PGR ou *MKi67* est inférieure au réglage seuil du test. Pour ces cibles, un signal *CYFIP1* minimum supplémentaire est requis pour que le résultat du test soit valide.
- **Contrôle de vérification des sondes (CVS):** Avant le début de la réaction PCR, le système GeneXpert mesure le signal de fluorescence des sondes pour surveiller la réhydratation des billes, le remplissage des tubes réactionnels, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome. Le CVS est réussi s'il répond aux critères d'acceptation validés.
- **Contrôles externes (non fournis):** Des contrôles externes peuvent être utilisés conformément aux exigences des organisations d'accréditation locales, régionales et nationales, selon les besoins.

15 Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés automatiquement par le système GeneXpert à partir des signaux de fluorescence mesurés et des algorithmes de calcul intégrés, et ils sont clairement affichés dans les onglets Résultats du test (Test Results) et Résultat de l'analyte (Analyte Result) de la fenêtre Afficher les résultats (View Results). Les données Résultats du test et Résultats de l'analyte sont également indiquées dans le rapport de test. Les résultats possibles sont présentés dans Tableau 1 et Tableau 2.

Tableau 1. Ensemble de tous les résultats possibles avec le test Xpert Breast Cancer STRAT4

Résultat affiché	CYFIP1	CYFIP1 alternatif	CIC
ESR1 POSITIF (ESR1 POSITIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
ESR1 NÉGATIF (ESR1 NEGATIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
PGR POSITIF (PGR POSITIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
PGR NÉGATIF (PGR NEGATIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS	POS ou NÉG
ERBB2 POSITIF (ERBB2 POSITIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
ERBB2 NÉGATIF (ERBB2 NEGATIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
MKi67 POSITIF (MKi67 POSITIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	POS ou NÉG
MKi67 NÉGATIF (MKi67 NEGATIVE)	RÉUSSITE (PASS)	POS	POS ou NÉG
PGR INDÉTERMINÉ (PGR INDETERMINATE)	RÉUSSITE (PASS)	NÉG	POS ou NÉG
MKi67 INDÉTERMINÉ (MKi67 INDETERMINATE)	RÉUSSITE (PASS)	NÉG	POS ou NÉG
RÉPÉTER LE TEST	RÉUSSITE (PASS)	POS ou NÉG	NÉG
NON VALIDE (INVALID)	ÉCHEC (FAIL)	NÉG	POS ou NÉG
ERREUR (ERROR)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)
PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)

Tableau 2. Résultats représentatifs et interprétation du test Xpert Breast Cancer STRAT4

Résultat	Interprétation
ESR1 POSITIF (ESR1 POSITIVE) Voir Figure 2.	• Le transcrit d'ARNm de l'*ESR1* est surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) au-dessus du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
PGR POSITIF (PGR POSITIVE) Voir Figure 2.	• Le transcrit d'ARNm du *PGR* est surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) au-dessus du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.

Résultat	Interprétation
ERBB2 POSITIF (ERBB2 POSITIVE) Voir Figure 2.	• Le transcrit d'ARNm de l'*ERBB2* est surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) au-dessus du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
MKi67 POSITIF (MKi67 POSITIVE) Voir Figure 2.	• Le transcrit d'ARNm du *MKi67* est surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) au-dessus du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
ESR1 NÉGATIF (ESR1 NEGATIVE) Voir Figure 3.	• Le transcrit d'ARNm de l'*ESR1* n'est pas surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) en dessous du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
PGR NÉGATIF (PGR NEGATIVE) Voir Figure 3.	• Le transcrit d'ARNm du *PGR* n'est pas surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) en dessous du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • *CYFIP1* alternatif – POS ; le *CYFIP1* présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
ERBB2 NÉGATIF (ERBB2 NEGATIVE) Voir Figure 3.	• Le transcrit d'ARNm de l'*ERBB2* n'est pas surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) en dessous du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
MKi67 NÉGATIF (MKi67 NEGATIVE) Voir Figure 3.	• Le transcrit d'ARNm du *MKi67* n'est pas surexprimé et présente une différence de cycles seuil (dCt) en dessous du seuil. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • *CYFIP1* alternatif – POS ; le *CYFIP1* présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.

Résultat	Interprétation
PGR Indéterminé (PGR Indeterminate) Voir Figure 4.	• Le niveau d'expression de l'ARNm du *PGR* ne peut pas être déterminé car l'échantillon ne contient pas assez de matériel. Répéter le test en utilisant un lysat plus concentré. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • *CYFIP1* alternatif – NÉG ; le cycle seuil (Ct) du *CYFIP1* n'était pas dans la plage de validation ou le point final était en dessous du seuil défini nécessaire pour la détermination du statut du PGR. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
MKi67 Indéterminé (MKi67 Indeterminate) Voir Figure 4.	• Le niveau d'expression de l'ARNm du *MKi67* ne peut pas être déterminé car l'échantillon ne contient pas assez de matériel. Répéter le test en utilisant un lysat plus concentré. • CYFIP1 – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • CYFIP1 alternatif – NÉG ; le cycle seuil (Ct) du *CYFIP1* n'était pas dans la plage de validation ou le point final était en dessous du seuil défini nécessaire pour la détermination du statut du MKi67. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
RÉPÉTER LE TEST (REPEAT TEST) Voir Figure 5.	• Les niveaux d'expression de l'ARNm d'*ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* ne peuvent pas être déterminés. Répéter le test en utilisant une quantité aliquote de lysat d'échantillon FFPE conservé. • *CYFIP1* – RÉUSSITE (PASS) ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté et présente un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et le point final est au-dessus du seuil défini. • *CYFIP1* alternatif – POS/NÉG ; le transcrit d'ARNm du *CYFIP1* a été détecté. Le transcrit peut présenter ou non un cycle seuil (Ct) dans la plage de validation et un point final au-dessus du seuil défini. • CIC – NÉG ; le contrôle interne présente un cycle seuil (Ct) en dehors de la plage de validation. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.
NON VALIDE (INVALID)	• NON VALIDE (INVALID) – Les niveaux d'expression de l'ARNm d'*ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* ne peuvent pas être déterminés car l'échantillon ne contient pas assez de matériel. Répéter le test en utilisant un lysat plus concentré. • *CYFIP1* – ÉCHEC (FAIL) ; le cycle seuil (Ct) de *CFYIP1* n'était pas dans la plage de validation ou le point final était en dessous du seuil défini. • *CYFIP1* alternatif – NÉG ; le cycle seuil (Ct) du *CFYIP1* n'était pas dans la plage de validation ou le point final était en dessous du seuil défini. • Vérification des sondes – RÉUSSITE (PASS) ; tous les résultats de vérification des sondes ont réussi.

Résultat	Interprétation
ERREUR (ERROR)	• Les niveaux d'expression de l'ARNm d'*ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* ne peuvent pas être déterminés. Répéter le test en utilisant une quantité aliquote de lysat d'échantillon FFPE conservé. • *ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* – PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT) • *CYFIP1/CYFIP1* alternatif – PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT) • Vérification des sondes – RÉUSSITE* (PASS*)/ÉCHEC (FAIL) ; échec d'un ou de plusieurs résultats de vérification des sondes. * Si la vérification des sondes a réussi, l'erreur est due au dépassement de la limite de pression maximale au-delà de la plage acceptable, à une erreur d'ajustement de la courbe ou à la défaillance d'un composant du système.
PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)	• Les niveaux d'expression de l'ARNm d'*ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* ne peuvent pas être déterminés. Les données recueillies sont insuffisantes pour produire un résultat de test. Par exemple, cela peut arriver si l'opérateur a interrompu un test en cours. Répéter le test en utilisant le lysat d'échantillon FFPE conservé. • *ESR1/PGR/ERBB2/MKi67* – PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT) • *CYFIP1/CYFIP1* alternatif – PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT) • Vérification des sondes – SO (sans objet) (Probe Check – NA [not applicable])

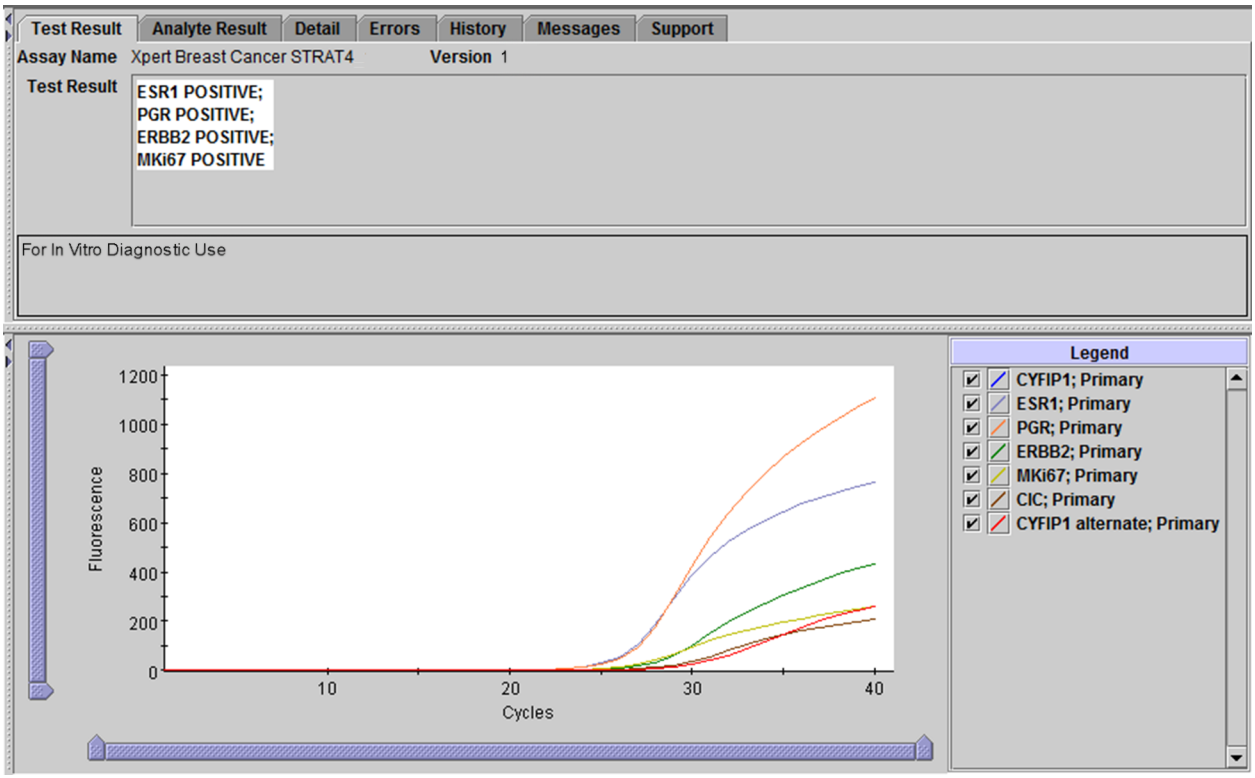


Figure 2. Fenêtre Afficher les résultats (View Results) du système GeneXpert Dx : ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIF

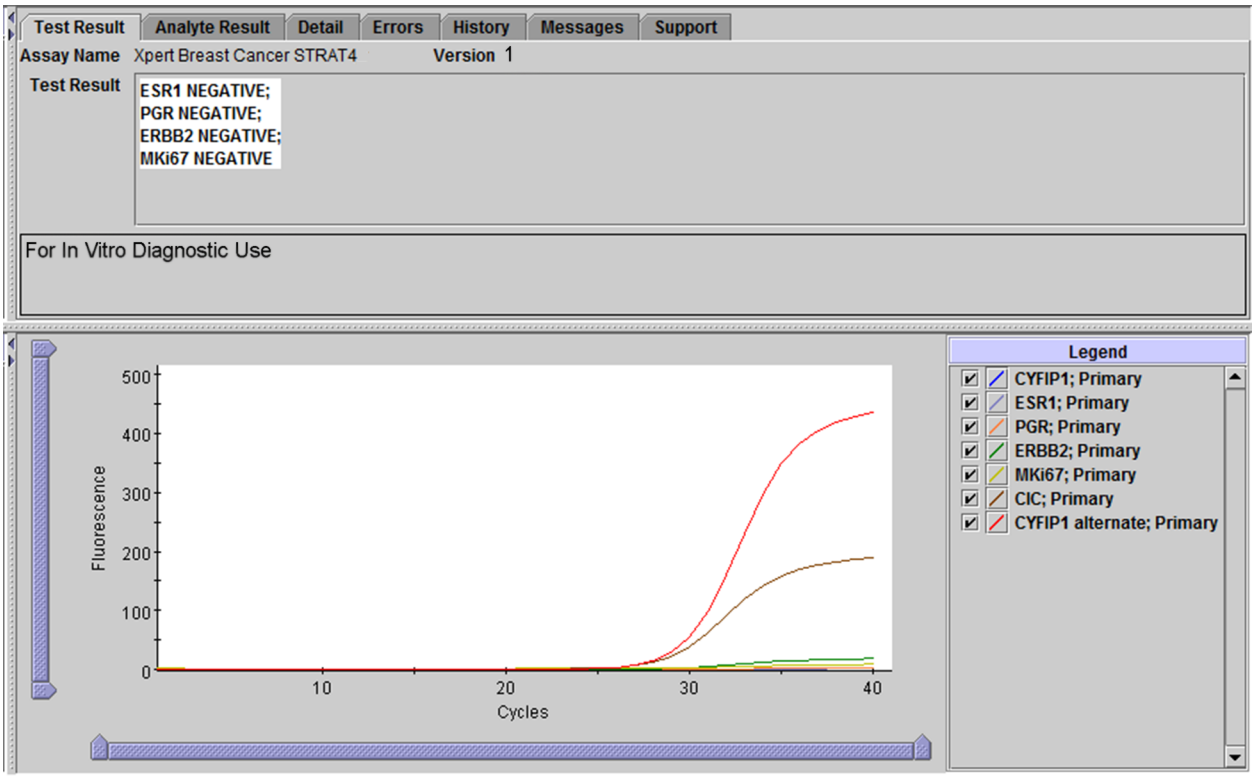


Figure 3. Fenêtre Afficher les résultats (View Results) du système GeneXpert Dx : ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NÉGATIF

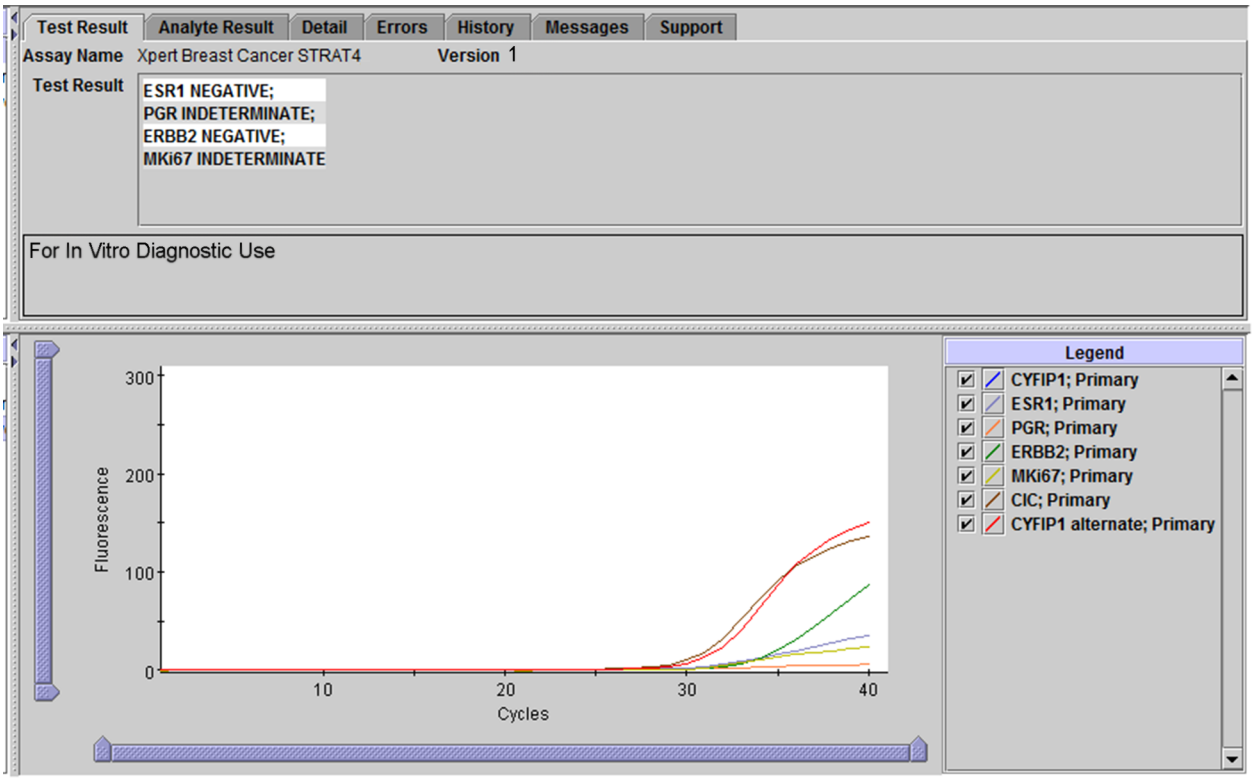


Figure 4. Fenêtre Afficher les résultats (View Results) du système GeneXpert Dx : PGR/MKi67 INDÉTERMINÉ

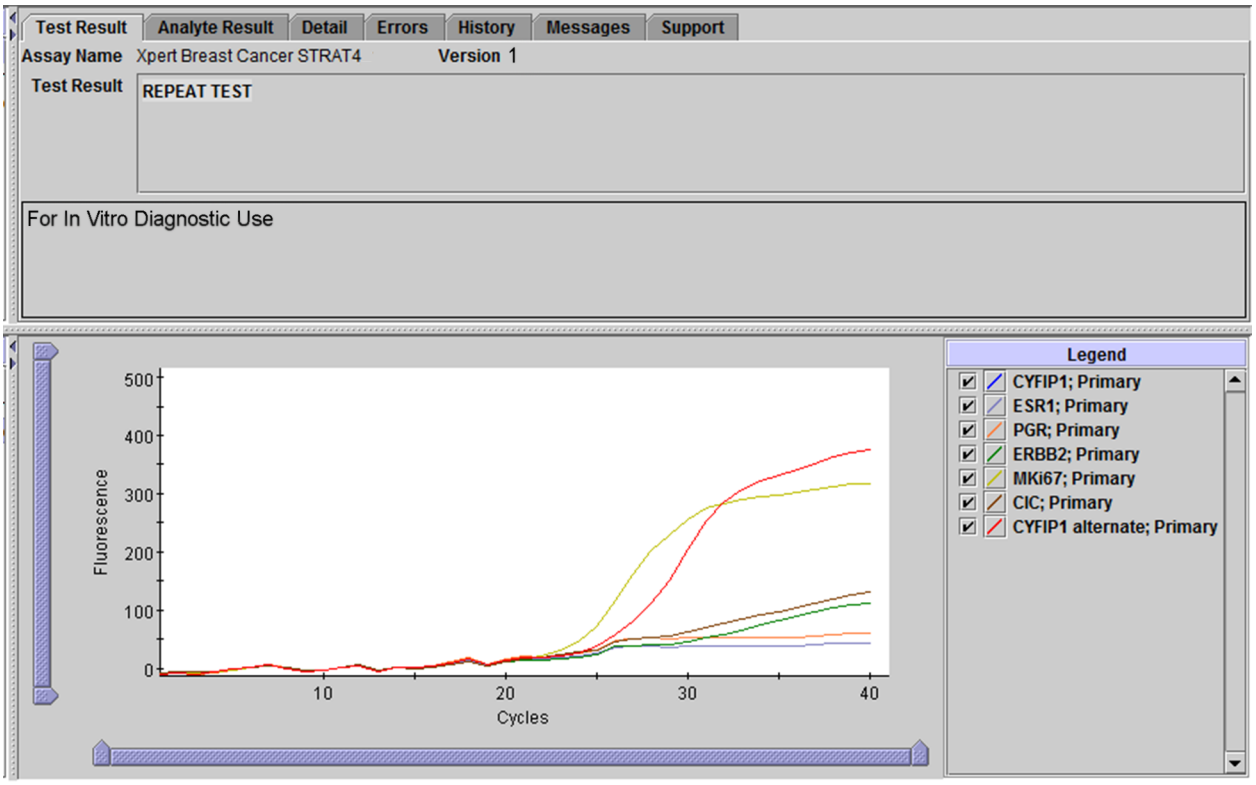


Figure 5. Fenêtre Afficher les résultats (View Results) du système GeneXpert Dx : RÉPÉTER LE TEST

16 Raisons pour lesquelles le test doit être répété

Répéter le test avec une nouvelle cartouche (ne pas réutiliser la cartouche).

- Un résultat **RÉPÉTER LE TEST (REPEAT TEST)** indique que le contrôle interne a échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement. Dans ce cas, répéter le test en utilisant une nouvelle quantité aliquote de 520 µl du même lysat FFPE.
- Un résultat **NON VALIDE (INVALID)** indique que le contrôle de référence a échoué. L'échantillon n'a pas été traité de manière appropriée, la PCR a été inhibée ou la qualité de l'ARN dans la tumeur accessible était insuffisante. Dans ce cas, répéter le test avec un lysat FFPE plus concentré en suivant les instructions du mode d'emploi du FFPE Lysis Kit.
- Un résultat **ERREUR (ERROR)** indique que le contrôle de vérification des sondes a échoué et que le test a été annulé, possiblement en raison d'un tube réactionnel mal rempli, de la détection d'un problème d'intégrité de la sonde, d'un dépassement des limites de pression maximale ou de la détection d'une erreur de positionnement de vanne. Dans ce cas, répéter le test en utilisant une nouvelle quantité aliquote de 520 µl du même lysat FFPE.
- Un résultat **PAS DE RÉSULTAT (NO RESULT)** indique que les données recueillies étaient insuffisantes. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours ou une panne de courant s'est produite. Dans ce cas, répéter le test en utilisant une nouvelle quantité aliquote de 520 µl du même lysat FFPE.
- Si un CQ externe ne réussit pas conformément aux attentes, répéter le test du contrôle externe et/ou contacter Cepheid pour assistance.

17 Limites

- Des modifications apportées à ces procédures peuvent modifier les performances du test. Les résultats du test Xpert Breast Cancer STRAT4 doivent être interprétés conjointement avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien.
- Les performances du test Xpert Breast Cancer STRAT4 ont été validées en utilisant les procédures indiquées dans ce mode d'emploi et en utilisant des échantillons FFPE âgés de cinq à dix ans.
- Les performances du test Xpert Breast Cancer STRAT4 ont été validées en utilisant uniquement les procédures indiquées dans ce mode d'emploi.

- Des résultats de test erronés peuvent se produire en raison d'un prélèvement, d'une manipulation ou d'une conservation incorrecte de l'échantillon ou d'une confusion entre les échantillons. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de ce mode d'emploi afin d'éviter des résultats erronés.
- Les caractéristiques des performances n'ont pas été établies pour les patients dont l'âge est < 25 ans.
- Des mutations ou polymorphismes dans les régions de fixation de l'amorce ou de la sonde peuvent produire des résultats erronés mais plausibles pour *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* et *MKi67*.

18 Caractéristiques de performance

18.1 Performances cliniques

Les caractéristiques des performances du test Xpert Breast Cancer STRAT4 ont été évaluées par rapport aux résultats IHC pour les récepteurs ER, PR, HER2 et Ki67, et par rapport aux résultats de la fluorescence in situ par hybridation (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH) pour l'amplification du gène HER2 dans des centres aux États-Unis et dans l'UE. Au départ, un total de 211 échantillons FFPE anonymisés restants de tumeurs primaires de cancer invasif du sein provenant des États-Unis et de l'UE ont été inscrits dans cette étude. 10 échantillons ont été exclus, car la quantité de tumeur disponible pour les tests était insuffisante, un échantillon a été exclu car le consentement a été retiré. Par conséquent, un total de 200 échantillons étaient disponibles pour l'inclusion dans les analyses de données. Pour chaque échantillon FFPE, plusieurs lames ont été préparées pour le test Xpert, pour les tests IHC de ER, PR, HER2, Ki67, et pour les tests FISH de l'amplification du gène HER2.

Globalement, le test Xpert Breast Cancer STRAT4 a fourni des résultats valides à la première tentative pour 99,5 % (199/200) des échantillons d'étude. Un échantillon qui au départ a donné un résultat indéterminé (**ERREUR [ERROR]**, **NON VALIDE [INVALID]** ou **PAS DE RÉSULTAT [NO RESULT]**), a donné un résultat de test après une seule répétition. Le taux de succès global du test était de 100,0 % (200/200).

Sur les 200 échantillons avec des résultats de test Xpert valides, ESR1 et ERBB2 ont donné un résultat de test positif ou négatif valide 100 % du temps (200/200). Pour le PGR et le MKi67, le test Xpert a donné un résultat de test positif ou négatif valide dans 98,5 % (197/200) et 97,0 % (194/200) des cas respectivement. Les 7 échantillons avec des résultats Xpert indéterminés pour le PGR et/ou le MKi67 ont été testés de nouveau en utilisant la méthode de lysat FFPE concentré. montre les résultats du premier test et de la deuxième tentativ Tableau 3.

Pour l'intégralité de l'ensemble de données, y compris les résultats de tests répétés, Xpert Breast Cancer STRAT4 a montré un pourcentage de concordance positif (PCP) de 97,2 %, un pourcentage de concordance négatif (PCN) de 95,0 % et un pourcentage de concordance globale (PCG) de 97,0 % opur l'ESR1 par rapport à l'IHC ;[18] un PCP de 88,4 %, un PCN de 90,7 % et un PCG de 88,9 % pour le PGR par rapport à l'IHC ;[18] un PCP de 100,0 %, un PCN de 92,4 % et un PCG de 93,3 % pour l'ERBB2 par rapport à l'IHC ;[19] et un PCP de 100 %, un PCN de 92,0 % et un PCG de 93,3 % pour l'ERBB2 par rapport au test FISH de HER2.[19] Pour le MKi67, le PCP est de 88,8 %, le PCN est de 100 % et le PCG est de 90,7 % si le seuil pour l'IHC est défini à > 20 % pour les échantillons positifs et à < 10 % pour les échantillons négatifs. Les échantillons intermédiaires du test IHC pour le MKi67 (seuil de 10 % à 20 %, inclusif) ont été exclus de l'analyse. Le PCP, le PCN et le PCG globaux pour chaque cible sont indiqués dans le Tableau 3.

Tableau 3. Performances cliniques

Comparaison	Ensemble de données[a]	Total (n)[b]	PCP	95% IC à	PCN	95% IC à	PCG	95% IC à
ESR1/ER Xpert vs IHC	Test initial	199	97,2 % (174/179)	93,6 – 98,8	100 % (20/20)	83,9 – 100	97,5 % (194/199)	94,3 – 98,9
	Test répété	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	Test initial	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
	Test répété	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	Test initial	180	100 % (22/22)	85,1 – 100	92,4 % (146/158)	87,2 – 95,6	93,3 % (168/180)	88,7 – 96,1
	Test répété	180	100 % (22/22)	85,1 – 100	92,4 % (146/158)	87,2 – 95,6	93,3 % (168/180)	88,7 – 96,1

Comparaison	Ensemble de données[a]	Total (n)[b]	PCP	95% IC à	PCN	95% IC à	PCG	95% IC à
ERBB2/HER2 Xpert vs FISH	Test initial	178	100 % (28/28)	87,9 – 100	92,0 % (138/150)	86,5 – 95,4	93,3 % (166/178)	88,6 – 96,1
	Test répété	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	Test initial	197	100 % (27/27)	87,5 – 100	91,2 % (155/170)	86,0 – 94,6	92,4 % (182/197)	87,8 – 95,3
	Test répété	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	Test initial	148	88,7 % (110/124)	81,9 – 93,2	100 % (24/24)	86,2 – 100	90,5 % (134/148)	84,7 – 94,3
	Test répété	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 = 1X lysat conformément aux instructions du mode d'emploi ; Test répété = tester de nouveau le résultat en utilisant un lysat concentré (4X) dans les cas où l'échantillon d'origine (1X lysat) a donné un résultat indéterminé pour le PGR et/ou le MKi67.

[b] Les échantillons avec des résultats non déterminés ou indéterminés pour le test Xpert, les échantillons avec des résultats équivoques ou intermédiaires pour l'ICH, les échantillons ayant échoué à l'IHC et au test FISH sont exclus.

19 Performances analytiques

19.1 Sensibilité analytique/quantité minimale pour le test

La quantité minimale pour le test a été déterminée en évaluant le Ct maximum de CYFIP1 (gène de référence) qui détermine avec précision la quantité d'échantillon requise pour des performances robustes du test. Cette quantité d'échantillon assure que des résultats valides sont obtenus dans la plupart des échantillons FFPE cliniques testés. Les échantillons ayant une valeur Ct de CYFIP1 supérieure à celle autorisée produiront un résultat **NON VALIDE (INVALID)** .

La sensibilité analytique/quantité minimale pour le test Xpert Breast Cancer STRAT4, définie comme le Ct maximum de CYFIP1 entraînant ≥95 % de résultats valides, a été établie en utilisant des dilutions de lysats d'échantillons FFPE cliniques afin de mettre au défi le Ct de CYFIP1. Pour évaluer la sensibilité du Ct de CYFIP1, un lysat d'échantillon FFPE clinique a été dilué en série et testé avec N=20 réplicats par niveau de dilution pendant 3 jours jusqu'à l'obtention de ≤95 % de résultats de test valides. Les niveaux de dilution ont inclus un échantillon ayant la quantité minimale attendue pour le test, et deux niveaux en dessous et deux niveaux au-dessus de cette quantité. Les tests ont été réalisés sur deux lots de cartouches Xpert Breast Cancer STRAT4.

Avant le lancement de l'étude, on a réalisé des tests de limite du blanc avec N=60 réplicats en utilisant deux lots indépendants de cartouches Xpert Breast Cancer STRAT4. L'échantillon pour le test de limite du blanc était une coupe en paraffine à blanc (pas d'échantillon tissulaire), et tous les résultats de test ont montré les résultats NON VALIDES (INVALID) attendus. **NON VALIDE (INVALID)** Des dilutions en série de l'échantillon tissulaire FFPE clinique réalisées au 1/1000e ont conduit à 20/20 Ct de CYFIP1 valides avec un Ct moyen = 33,4 et un ET de 0,6 SD pour le lot 1 du test Xpert Breast Cancer STRAT4 et un Ct moyen = 33,6 et un ET de 0,5 pour le lot 2. Des dilutions supplémentaires avec des valeurs Ct de CYFIP1 ultérieures n'ont pas produit les résultats valides ≥95 % requis pour l'étude. Le Tableau 4 résume le nombre de séries de tests valides pour chaque niveau d'entrée de l'échantillon dilué en série en tant que dilution relative ou Ct moyen de CYFIP1. La sensibilité analytique en utilisant deux lots de cartouches du test Xpert Breast Cancer STRAT4 a montré que la quantité d'entrée minimale requise pour le test pour le Ct de CYFIP1 = 33,4. Cette valeur, associée à la variabilité du test, permettrait de définir une limite supérieure Ct de CYFIP1 = 35 pour le test Xpert Breast Cancer STRAT4.

Tableau 4. Quantité minimale d'entrée pour le test Xpert Breast Cancer STRAT4

Lot de kit	Quantité d'échantillon (dilution relative)	Ct moyen de CYFIP1	ET	Série valide N (Ct ≤ 35)
00801 (Lot 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

Lot de kit	Quantité d'échantillon (dilution relative)	Ct moyen de CYFIP1	ET	Série valide N (Ct ≤ 35)
	1/2000	34,2	0,5	9/20
	1/4000	34,5	0,5	2/20
	NTC	s.o.	s.o.	0/20
00903 (Lot 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	s.o.	s.o.	0/20

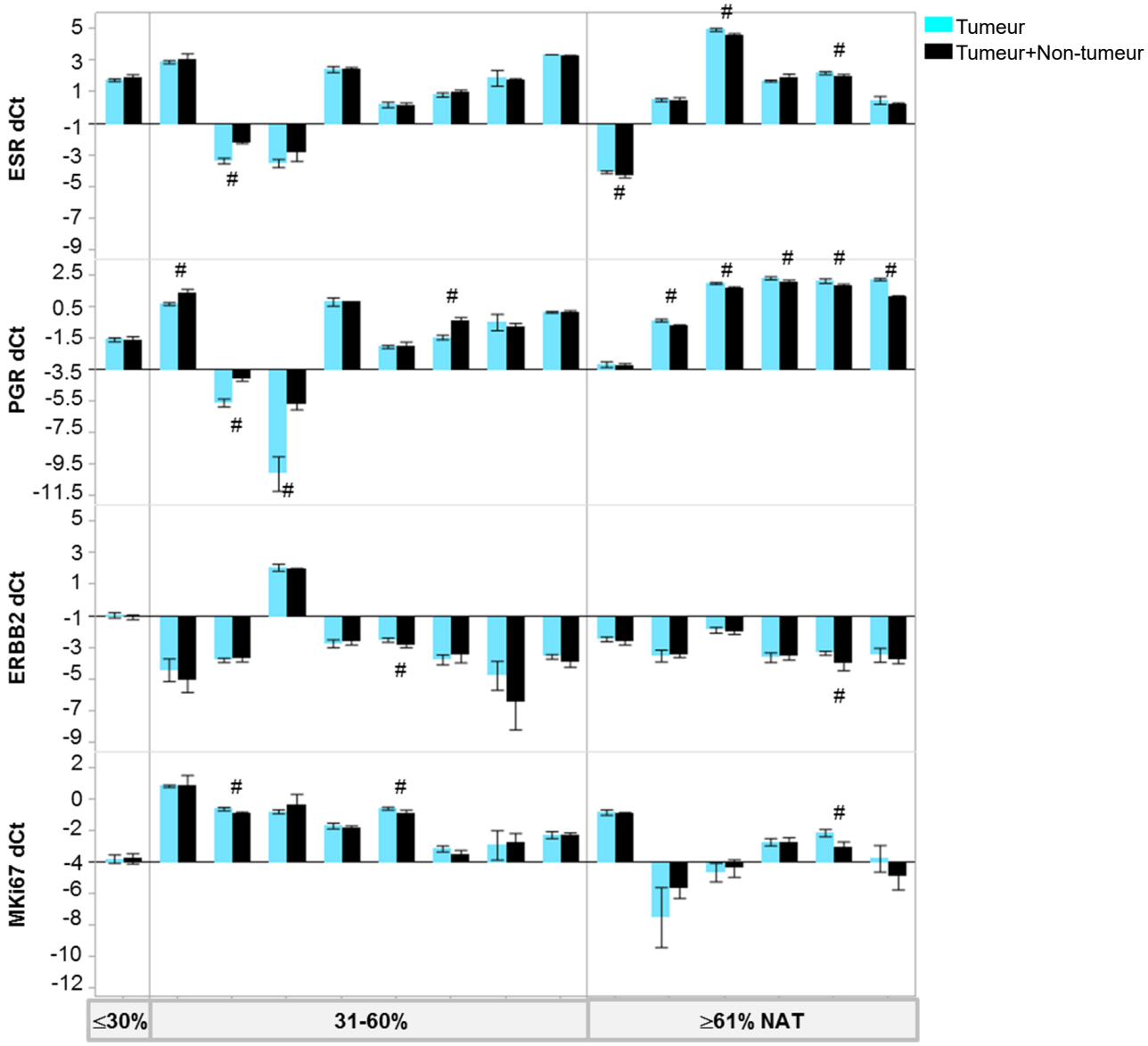
19.2 Tests d'interférence

Tissu adjacent normal/non tumoral

Les tissus adjacents normaux (non tumoraux) (TAN) sont fréquemment présents parmi les échantillons de tissu de cancer du sein sous forme de contaminants pouvant potentiellement interférer avec la détection d'une cible spécifique. Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 peut nécessiter la macrodissection d'une coupe de tumeur mammaire FFPE vérifiée pathologiquement afin de minimiser les effets potentiels des contaminants non tumoraux dans des cas pertinents tels que déterminés par un pathologiste. Afin d'évaluer l'effet des tissus adjacents normaux/non tumoraux, quinze (15) blocs de tissu FFPE avec un carcinome mammaire invasif contenant 21 à 98 % de tissu adjacent normal (TAN) environnant ont été testés avec le test Xpert Breast Cancer STRAT4 avec et sans macrodissection. Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 a été réalisé avec N=4 réplicats provenant du même lysat par pathologie. Les ΔCt pour ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67 pour chaque échantillon de tissu avec macrodissection (graphique à barres en bleu) ou sans macrodissection (graphique à barres en noir) ont été évalués d'abord par le biais d'une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle afin de déterminer les interférences statistiques du TAN. On estime que des interférences cliniquement significatives dues à TAN sont présentes lorsque le dΔCt (delta-delta Ct) entre les échantillons macrodisséqués et non macrodisséqués est de >1,0 et en cas de changement dans le résultat du test. Les résultats de l'étude sont résumés dans la Figure 6.

Les ΔCt pour ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67 des 15 échantillons ont été regroupés sur la base du % de NAT (≤ 30 %, 31 à 60 % ou ≥ 61 %). Les graphiques à barres verticales bleues et noires avec ET représentent les ΔCt cible moyennes de N=4 réplicats de coupes FFPE macrodisséquées et non macrodisséquées d'un bloc de tissu FFPE provenant d'un cancer du sein invasif. Les 15 blocs FFPE (N=1 avec un TAN en dessous de 30 %, N=8 avec un TAN de 31 à 60 %, and N=6, avec un TAN au-dessus de 60 %) ont montré qu'il n'y a ni signification statistique de l'interférence due à des tissus adjacents normaux/non tumoraux sur la base des analyses ANOVA unidirectionnelles avec une valeur p ≥ 0,05, ni signification clinique (avec l'indication #) si la variation dans les valeurs delta Ct de chaque cible entre les échantillons macrodisséqués et les échantillons non macrodisséqués est de ≤ 1,0 ou lorsque les résultats cible du test (positifs, négatifs) restent non affectés.

Figure 6. Interférence due au tissu adjacent normal/non tumoral au niveau des ΔCt cible du test Xpert Breast Cancer STRAT4



Tissu CCIS (carcinome canalaire in situ), nécrotique et hémorragique

Pour évaluer l'effet des tissus du carcinome canalaire in situ (CCIS), nécrotiques et hémorragiques, un total de 9 échantillons FFPE de tumeur du sein (3 blocs de tumeur du sein FFPE contenant 3 à 61 % de CCIS, 3 blocs FFPE contenant 10 à 65 % de tissu nécrotique et 3 blocs FFPE contenant 15 à 41 % de tissu hémorragique) ont été testés avec le test Xpert Breast Cancer STRAT4 avec et sans macrodissection. Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 a été réalisé avec N=4 réplicats provenant du même lysat par pathologie. Il a été établi que pour toutes les conditions de test, il n'y avait aucun impact soit statistiquement soit cliniquement significatif dû aux diverses contaminations provenant de tissus CCIS, nécrotiques et hémorragiques lors de l'utilisation du test Xpert Breast Cancer STRAT4 (les données graphiques ne sont pas présentées).

ADN génomique humain (ADNgh)

Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 utilise des amorces et des sondes hautement spécifiques pour une hybridation efficace avec les modèles d'ARNm cible de ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67 provenant d'un groupe d'acides nucléiques génomiques (ADN génomique humain = ADNgh). Afin d'évaluer l'effet de l'ADNgh sur le test Xpert Breast Cancer STRAT4, 10 blocs de tumeur du sein FFPE avec une teneur variable en cellules de carcinome canalaire invasif ont été macrodisséqués et testés avec et sans l'ajout de 25 ng d'ADNgh aux lysats d'échantillon FPPE en utilisant le test Xpert Breast Cancer STRAT4 dans

N=4 réplicats provenant du même lysat par pathologie. Il a été établi que pour toutes les conditions de test, il n'y avait aucun impact soit statistiquement soit cliniquement significatif dû à l'interférence de l'ADNgh (les données graphiques ne sont pas présentées).

19.3 Contamination par transfert

Une étude a été menée pour démontrer que les cartouches GeneXpert closes à usage unique minimisent la contamination par transfert des échantillons très fortement positifs dans des échantillons négatifs testés ultérieurement dans le même module GeneXpert. L'étude consistait à traiter un échantillon négatif dans le même module GeneXpert immédiatement après un échantillon fortement positif de ESR1/PGR/ERBB2/MKi67. L'échantillon négatif était constitué d'ARN transcrit *in vitro* (TIV) contenant 5 x 10^4 copies de transcrit de CYFIP1 afin d'assurer la présence d'un gène de référence cible. L'échantillon fortement positif était constitué d'ARN TIV contenant 5 x 10^5 copies de transcrit de CYFIP1, et d'ARN TIV contenant 5 x 10^6 copies de transcrits de ESR1, PGR, ERBB2 et MKi67, préparé sous forme de lysat FFPE. Ce schéma d'analyse a été répété 41 fois en utilisant un seul module GeneXpert, pour un total de 20 échantillons fortement positifs et 21 échantillons négatifs. Les 20 échantillons fortement positifs ont été rapportés correctement comme ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIF (POSITIVE) et les 21 échantillons négatifs ont été rapportés correctement comme ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NÉGATIF (NEGATIVE).

19.4 Précision et reproductibilité du test

La reproductibilité du test Xpert Breast Cancer STRAT4 a été évaluée en utilisant un panel de cinq échantillons de lysat.

Trois membres du panel ont été préparés en ajoutant de l'ARN transcrit *in vitro* (TIV) à un tampon de lyse FFPE ensemencé à ~2dCt près des seuils dCt pour ESR1 (ARN TIV-1), PGR (ARN TIV-2) et ERBB2 (ARN TIV-3), et ayant des valeurs Ct de CYFIP1 de ~2-3 Ct du niveau d'entrée minimale pour le test.

Deux membres du panel (un échantillon FFPE clinique-4 et un échantillon FFPE clinique-5) ont été créés à partir d'échantillons FFPE cliniques groupés dans un tampon de lyse FFPE afin de générer des valeurs Ct de CYFIP1 près de l'entrée minimale pour le test et ayant des valeurs seuil dCt pour toutes les cibles dans la plage pouvant être rendue et, dans la mesure du possible, près des seuils dCt pour le test.

Deux opérateurs dans chacun des trois centres d'étude ont testé deux panels de cinq échantillons par jour sur six jours d'analyse (cinq échantillons x six jours x deux opérateurs x deux réplicats x trois centres). Un total de 72 réplicats par échantillon a été testé. Trois lots de cartouches Xpert Breast Cancer STRAT4 ont été utilisés dans chacun des trois centres d'analyse. Le test Xpert Breast Cancer STRAT4 a été réalisé conformément à la procédure dans ce mode d'emploi.

La reproductibilité du test Xpert Breast Cancer STRAT4 a été évaluée en termes du ΔCt pour chacune des quatre cibles de chaque panel. La moyenne, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) inter-sites, inter-jours, inter-lots, inter-opérateurs et intra-tests pour chaque membre du panel sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Synthèse des données de reproductibilité

Échantillon	Canal de test (analyte)	N[a]	dCt moyen	Inter-sites		Inter-lots		Inter-jours		Inter-opérateurs		Intra-test		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

Échantillon	Canal de test (analyte)	N[a]	dCt moyen	Inter-sites		Inter-lots		Inter-jours		Inter-opérateurs		Intra-test		Total	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
	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
4-Échantillon FFPE clinique	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-Échantillon FFPE clinique	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] Résultats avec valeurs delta Ct valides sur 72

20 Bibliographie

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, Tuchler 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, Karaolanis 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, 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. Biomarqueur 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, Fitsgibbons 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. RÈGLEMENT (CE) n° 1272/2008 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL DU 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, liste des conseils de prudence, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE (modifiant le règlement (CE) n° 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 Emplacements des sièges de Cepheid

Siège social

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Siège européen

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Support technique

Avant de contacter le service du support technique de Cepheid, recueillir les informations suivantes :

- Nom du produit
- Numéro de lot
- Numéro de série de l'instrument
- Messages d'erreur (le cas échéant)
- Version logicielle et, le cas échéant, le « Service Tag » (numéro d'identification de l'ordinateur)

États-Unis

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

France

Téléphone : + 33 563 825 319
Email : support@cepheideurope.com

Les coordonnées de tous les bureaux du service du support technique de Cepheid sont disponibles sur notre site Internet à l'adresse suivante : www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Tableau des symboles

Symbole	Signification
	Numéro de référence
	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
	Marquage CE — Conformité européenne
	Mandataire agréé pour la Communauté européenne
	Ne pas réutiliser
	N° de lot
	Consulter la notice d'utilisation
	Mise en garde
	Fabricant
	Pays de fabrication
	Quantité suffisante pour *n* tests
	Contrôle
	Date de péremption
	Limite de température
	Risques biologiques
	Mandataire sis en Suisse
	Importateur

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

EC REP

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

CH REP

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

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

IVD CE

24 Historique des révisions

Section	Description des modifications
Dans l'intégralité du document	Suppression de toute référence au logiciel ONCore.