

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Navodila za uporabo



Blagovna znamka, patenti in izjave o avtorskih pravicah

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[®], logotip Cepheid, GeneXpert[®] in Xpert[®] so blagovne znamke družbe Cepheid, registrirane v ZDA in drugih državah.

Vse druge blagovne znamke so v lasti njihovih lastnikov.

NAKUP TEGA IZDELKA NA KUPCA PRENESE NEPRENOSLJIVO PRAVICO DO NJEGOVE UPORABE V SKLADU S TEMI NAVODILI ZA UPORABO. NA KUPCA SE NE PRENESE IZRECNO, IMPLICITNO ALI S PREKLJUŽIJO NOBENIH DRUGIH PRAVIC. POLEG TEGA SE Z NAKUPOM TEGA IZDELKA NE PRIDOBI PRAVIC ZA PREPRODAJO.

© 2017—2025 Cepheid.

Za podrobnosti o spremembah glejte Zgodovino revizij.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Diagnostični medicinski pripomoček *in vitro*

1 Lastniško ime

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Splošno ali običajno ime

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Namen uporabe

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je polkvantitativni test na osnovi verižne reakcije s polimerazo s kvalitativnimi mejnimi vrednostmi za estrogenski receptor (*ESR1*), receptor za progesteron (*PGR*), receptor za človeški epidermalni rastni faktor 2 (*ERBB2/HER2*) in označevalec širjenja Ki-67 (*MKi67*) mRNA, izolirane iz tkiva invazivnega raka dojke, fiksiranega s formalinom in vdelanega v parafin (FFPE). RNA se ekstrahira iz s tumorjem obogatenega dela mikroskopske rezine tkiva, kot ga je določil patolog. Test se uporablja v kombinaciji z drugimi kliničnimi in laboratorijskimi podatki za razvrščanje tkiv raka dojke glede na njihov status hormonskih receptorjev, status receptorjev HER2 in status označevalcev proliferacije. Test je namenjen za uporabo s sistemom GeneXpert[®], ki vključuje izolacijo RNA iz tkiva FFPE ter ojačanje in zaznavanje ciljnih zaporedij v vložku.

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 se ne uporablja:

- kot napovednik resnosti bolezni,
- kot samostojna naprava za diagnostično testiranje raka dojke,
- prognostično za ponovitev bolezni.

Indikacije za uporabo: Test je namenjen uporabi pri ocenjevanju ravni mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* in *MKi67* v tkivih invazivnega raka dojke, pridobljenih od pacientk in pripravljenih kot primerki FFPE, in kot pomoč pri klinični oceni v povezavi z drugimi laboratorijskimi podatki.

4 Povzetek in razlaga

S približno 1,7 milijona novih primerov raka dojke je ta vrsta raka globalno ena najpogostejših vrst raka pri ženskah.¹ V Evropi vsako leto odkrijejo približno 494.000 novih primerov in 143.000 bolnic zaradi te bolezni umre. V ZDA je bilo leta 2015 odkritih približno 200.000 novih primerov invazivnega raka dojke.² Rak dojke je najpogostejši vzrok smrtnosti zaradi raka pri ženskah v državah v razvoju in drugi najpogostejši vzrok smrtnosti zaradi raka (po pljučnem raku) med ženskami v razvitih državah.²

Po podatkih SZO je bil rak dojke v letu 2020 pri ženskah najpogostejše diagnosticiran rak in glavni vzrok smrtnosti¹ Umrljivost zaradi raka dojke se je od leta 1990 zmanjšala za 34 odstotkov, predvsem zaradi izboljšanega zdravljenja in zgodnjega odkrivanja.³ Meritve izraženosti beljakovin ER in PR so napovedne za izid raka dojke in napovedujejo odziv na tamoksifen in druge hormonske terapije.^{4,5,6,7} Prekomerna izraženost HER2 kaže na neugodno prognozo pri ženskah z rakom dojke; še pomembneje pa je, da prekomerna izraženost beljakovin HER2 (*ERBB2*) ali amplifikacija gena HER2 napovedujejo odziv na trastuzumab ali druge terapije, usmerjene v HER2.⁸ Označevalec širjenja Ki-67 (*MKi67*) je bil v retrospektivnih študijah, ki so vključevale bolnice z rakom dojke, obsežno preučevan⁹ in velja za pomemben pokazatelj potrebe po kemoterapiji.¹⁰ Metaanalize so pokazale povezavo s slabšimi rezultati preživetja pri zgodnjem raku dojke.¹¹

Glede na pomen teh označevalcev smernice zdravljenja Evropskega združenja za medicinsko onkologijo (ESMO) pri izbiri učinkovitega režima zdravljenja bolnic z rakom dojke priporočajo, da se v času diagnoze testirajo vsi primarni karcinomi dojke na ER, PR, HER2 (ERBB2) in Ki67.¹²

Imunohistokemija (IHC) se običajno uporablja za merjenje izražanja beljakovin ER, PR, HER2 in Ki67. Za izraženost HER2 je IHC običajno prvi opravljeni test, rezultati pa se poročajo na lestvici od 0 do 3+. Če je rezultat za izraženost HER2 (2+) dvoumen, se vzorec reflektira na test HER2 in situ hibridizacije (ISH), kot je fluorescenčna in situ hibridizacija (FISH) ali kromogena in situ hibridizacija (CISH), ki išče okrepljenost gena HER2.¹³ Pri IHC in ISH je bila v primerjavi z laboratoriji dokazana visoka stopnja variabilnosti rezultatov, predvsem zaradi razlik v protitelesih, uporabljenih za IHC, in subjektivnosti interpretacijskih metod.¹⁴

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je diagnostični test in vitro, ki se uporablja za določanje ravni izraženosti mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, in *MKi67*, izolirane iz primerkov FFPE tkiva invazivnega raka dojke.

Test se izvede v samostojnem vložku po kratkem koraku priprave lizata vzorca zunaj instrumenta, ki traja manj kot 15 minut časa ravnanja s celotnim časom obdelave manj kot 2 uri.

5 Načelo postopka

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 je test polimerazne verižne reakcije (PCR) v realnem času za odkrivanje mRNA *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* in *MKi67*, izolirane iz tkiva invazivnega raka dojke, fiksiranega s formalinom in vdelanega v parafin (FFPE). Test se izvaja na sistemih instrumentov GeneXpert družbe Cepheid. Sistemi instrumentov GeneXpert avtomatizirajo in integrirajo prečiščenje vzorca, ojačevanje nukleinske kisline in zaznavanje ciljnega zaporedja v enostavnih ali kompleksnih vzorcih s pomočjo reakcije RT-PCR v resničnem času. Sistem sestavljajo instrument, ročni čitalnik črtnih kod, osebni računalnik, in vnaprej naložena programska oprema za izvajanje testov in ogledovanje rezultatov. Sistem uporablja vložke GeneXpert za enkratno uporabo, ki vsebujejo reagente za reakcijo RT-PCR in v katerih potekajo postopki RT-PCR. Za poln opis sistema glejte priročnik za uporabo sistema instrumenta GeneXpert.

Test Xpert Breast Cancer STRAT4 vsebuje reagente za simultano zaznavanje *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, referenčnega gena za interakcijo beljakovine 1 (*CYFIP1*) s citoplazemskim *FMR1*, notranjo kontrolo RT-PCR (*CIC*) in notranjo kontrolo preverjanja sonde (*PCC*). Referenčni gen preveri ustreznost vzorca in se uporablja za normalizacijo ravni izražanja mRNA za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* in *MKi67*. Notranja kontrola RT-PCR (*CIC*) se uporablja za preverjanje, ali je reakcija RT-PCR potekala pravilno. *PCC* je namenjena preverjanju rehidracije postelje reagenta, polnjenju epruvete RT-PCR, celovitosti sonde in stabilnosti barve v vložku. Test uporablja šest ločenih fluorescentnih kanalov za odkrivanje cilja ali kontrole/referenc z lastnimi mejnimi parametri za veljavnost cilja/kontrole/referenc.

Vzorci FFPE je treba najprej obdelati s kompletom za lizo Xpert® FFPE s pripravo 4-5 µm (mikronov) debelega tkiva, kjer se tkivo FFPE najprej po potrebi makro-disecira, da se obogati območje invazivnega tumorja, nato pa se postrga in da v epruveto skupaj s priporočenimi količinami reagenta za lizo FFPE in proteinaze K. Raztopina se nato 30 minut inkubira v toplotnem bloku pri 80 °C. Nato se etanol zmeša z vzorcem in priporočena količina pripravljenega vzorca lizata se nato doda neposredno v testni vložek. Vložek za testiranje se vstavi v modul instrumentacijskega sistema GeneXpert, kjer so čiščenje, ojačanje in zaznavanje nukleinske kisline v realnem času popolnoma avtomatizirani in v celoti integrirani v sistem. Vsi reagenti, potrebni za pripravo vzorcev v instrumentu in analizo RT-PCR, so prednaloženi v vložek. Nukleinske kisline v lizatu se zajamejo na filter, sperejo in eluirajo z ultrazvokom. Prečiščeno nukleinsko kislino zmešamo s suhimi reagenti RT-PCR in raztopino prenesemo v reakcijsko cev za RT-PCR in zaznavo. Čas do rezultata v napravi GeneXpert je približno 75 minut.

Mejne vrednosti zaznavanja, ki jih test Xpert Breast Cancer STRAT4 uporablja v vsakem fluorescentnem kanalu, so bile ugotovljene tako, da maksimizirajo pozitivno, negativno in skupno odstotno skladnost v primerjavi z referenčnimi laboratorijskimi rezultati IHC ali IHC/FISH za vsak cilj. IHC za ER, PR, Ki67 in HER2 ter FISH za HER2 so bili obdelani in ocenjeni po navodilih v navodilih za uporabo. Interpretacija rezultatov je bila izvedena v skladu s smernicami ASCO/CAP 2013.¹⁵ Tumorji so bili klasificirani kot pozitivni na ER ali PRIHC, kadar je ≥ 1 % invazivnih tumorskih celic pokazalo določeno jedrsko obarvanje, ne glede na intenzivnost obarvanja. Izraženost HER2 je bila ocenjena s kompletom HercepTest (IHC) (Dako) in ovrednotena kot 0, 1+, 2+, ali 3+. Tumorji, ocenjeni kot 2+, so bili reflektirani v HER2 FISH s kompletom za sondo PATVysion HER2 DNA (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Primeri so se šteli za HER2-pozitivne, če so po IHC dosegli 3+ in/ali je bil s FISH okrepljen (opredeljen kot HER2:CEP17 (razmerje $\geq 2,0$) in/ali je bilo povprečno število kopij HER2 $\geq 6,0$ signalov/celic v skladu s posodobljenimi smernicami iz klinične prakse ASCO/CAP iz leta 2013 (2013 ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update) za testiranje HER2 pri raku dojke.¹⁵ Za Ki67 so bili tumorji razvrščeni kot pozitivni (visoko), ko je ≥ 20 % invazivnih tumorskih celic pokazalo določeno jedrsko obarvanje, ne glede na intenzivnost obarvanja.

V primeru referenčnega nadzora genov in notranjega kontrole RT-PCR mejne vrednosti zaznavanja opredeljujejo območja najnižjega in največjega praga cikla (Ct) vrednosti PCR, ki določajo veljaven rezultat, ustrezen minimalni vhodni vzorec in brez zaviranja PCR. V primeru ciljev ESR1, PGR, ERBB2 in MKi67 so mejne vrednosti zaznavanja opredeljene z vrednostmi delta praga (dCt) (referenčni gen Ct minus ciljni gen Ct), ki določajo POZITIVNE (POSITIVE) v primerjavi z NEGATIVNIMI (NEGATIVE) rezultate za dani cilj v kanalu.

6 Reagenti in instrumenti

6.1 Material na voljo

Komplet testa Xpert Breast Cancer STRAT4 vsebuje dovolj reagentov za obdelavo 10 vzorcev kontrole kakovosti oziroma lizatov FFPE, pripravljenih s kompletom Xpert FFPE Lysis Kit (kataloška št. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Komplet testa Xpert Breast Cancer STRAT4 vsebuje naslednje:

Vložke Xpert Breast Cancer STRAT4 z vgrajenimi reakcijskimi epruветami	10
• Zrno 1, 2 in 3 (liofilizirano)	1 na vložek
• Reagent za izpiranje	1,0 ml na vložek
• Elucijski reagent	2,0 ml na vložek
CD	1 na komplet
• Datoteka z opredelitvijo testa (Assay Definition File – ADF)	
• Navodila za uporabo	

Opomba Varnostni listi (SDS), ki so na voljo na spletnem naslovu www.cepheid.com ali www.cepheidinternational.com v zavihku **PODPORA (SUPPORT)**.

Opomba Goveji serumski albumin (BSA) v zrnih v tem izdelku je bil izdelan in proizveden izključno iz goveje plazme, pridobljene v Združenih državah. Živali niso bile hranjene z beljakovinami prežvekovalcev ali drugih živali. Živali so bile testirane pred zakolom in po njem. Med obdelovanjem se material ni mešal z drugimi živalskimi materiali.

7 Shranjevanje in uporaba

- Vsebinsko kompleta testa Xpert Breast Cancer STRAT4 shranjujte pri temperaturi 2–28 °C.
- Pokrovčka vložka ne odpirajte, dokler niste pripravljeni na izvajanje testa.
- Vložek uporabite v 30 minutah po odprtju pokrova vložka.
- Ne uporabljajte vložka, ki pušča.

8 Materiali, ki so potrebni, a niso dostavljeni

- Komplet za lizo Xpert FFPE (kataloška št. GXFFPE-LYSIS-CE-10) za pripravo lizata FFPE. Ta komplet je sestavljen iz reagenta za lizo FFPE, proteinaze K (PK), 1,5 ml epruвет in 5 ml vial.
- Vibracijski mešalnik
- Pipete in konice pipet za aerosolni filter, primerne za pipetiranje 600 µl in 520 µl.
- Računalnik z lastniško programsko opremo GeneXpert različice 4.7b ali novejšo ali Xpertise 6.4b ali novejšo, bralnik črtnih kod in navodila za uporabo ustreznega sistema GeneXpert
- Tiskalnik: Če potrebujete tiskalnik, stopite v stik z oddelkom za tehnično podporo družbe Cepheid, da se dogovorite za nakup priporočenega tiskalnika.

9 Opozorila in previdnostni ukrepi

- Samo za *in vitro* diagnostično uporabo.
- Z vsemi biološkimi vzorci je treba ravnati, kot da bi lahko prenašali nalezljive povzročitelje. Vse človeške vzorce je treba obdelati s standardnimi previdnostnimi ukrepi. Smernice za ravnanje s primerki so na voljo pri Svetovni zdravstveni organizaciji ali ameriških centrih za nadzor in preprečevanje bolezni.
- Upoštevajte varnostne postopke svoje ustanove za delo s kemikalijami in ravnanje z biološkimi vzorci.
- Značilnosti učinkovitosti tega testa so bile ugotovljene samo za vrste primerkov, navedene v Razdelek 3. Učinkovitost tega testa za druge vrste vzorcev ali vzorce ni bila ocenjena.
- Tkivo FFPE je treba obdelati s kompletom za lizo Xpert FFPE (kataloška št. GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Nepopolno odstranjevanje (strganje) tumorskega področja s stekelca za pripravo lizata FFPE lahko povzroči premalo materiala za test in zato večjo stopnjo nedoločljivih/neveljavnih rezultatov s testom Xpert Breast Cancer STRAT4 od pričakovane.
- Pokrova vložka testa Xpert Breast Cancer STRAT4 ne odpirajte, razen za dodajanje pripravljenega lizata FFPE.
- Ne uporabljajte vložka, ki vam je padel, ko ste ga vzeli iz ovojnine.
- Vložka ne stresajte. Če vložek stresate oziroma vam ta pade po odprtju pokrovčka vložka, lahko pride do neveljavnih rezultatov.
- Ne uporabljajte vložka, ki ima poškodovano reakcijsko epruveto.
- Vsak vložek za enkratno uporabo testa Xpert Breast Cancer STRAT4 se uporabi za obdelavo enega vzorca. Uporabljenih vložkov ne uporabite ponovno.
- Ne uporabite vložka, če je videti moker ali če tesnilo pokrovčka deluje nepopolno.
- Oznake ID vzorca ne namestite na pokrovček vložka ali na črtno kodo.
- Priporočajo se dobre laboratorijske prakse, vključno z zamenjavo rokavic v času med delom s posameznimi bolnikovimi vzorci, da se prepreči kontaminacija vzorcev ali reagentov.
- Za pravilno odstranitev uporabljenih vložkov in neuporabljenih reagentov se posvetujte z osebjem svoje ustanove za ravnanje z okoljskimi odpadki. Preverite državne, območje in lokalne predpise, saj se lahko razlikujejo od nacionalnih predpisov o odstranjevanju. Ti materiali imajo lahko lastnosti nevarnih odpadkov, ki jih je treba odlagati na točno določen način. Ustanove morajo preveriti zahteve glede odlaganja nevarnih odpadkov.

10 Kemične nevarnosti^{16,17}

V skladu z globalno usklajenim sistemom za razvrščanje in označevanje (GHS) ta material ne velja za nevarnega.

11 Odvzem vzorca, transport in shranjevanje

- Uporabljajte samo z vzorci FFPE, obdelanimi s kompletom Xpert FFPE Lysis Kit (kataloška št. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Sledite smernicam ASCO/CAP¹⁵ za pripravo tkiva FFPE.
- Lizat FFPE je treba pripraviti iz tumorskega bloka FFPE z največjo površino viabilnega karcinoma dojke (najmanj 30 % celičnosti tumorja), po potrebi pa ga je treba pred testiranjem s testom Xpert Breast Cancer STRAT4 ročno makro-disektirati. Za vzorce tumorjev manjše kot 10 mm² z manj kot 30 % tumorja bo za veljavne rezultate morda potrebna uporaba postopka koncentriranega lizata ali več kot en odsek 4-5 µm.
- Lizat FFPE je treba v laboratorij prenesti pri temperaturi 2–8 °C.
- Lizat FFPE je stabilen do 1 tedna pri 2–8 °C ali 4 tedne pri ≤ -20 °C pred testiranjem s testom raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4. Za dolgotrajno skladiščenje shranjujte pri -80 °C. Priporočljivo ga je največ 1-krat zamrzniti in odtajati. Pri odtajanju lizata FFPE pred uporabo odtajajte na sobno temperaturo in ga 15 sekund vrtinčite.

12 Postopek

Pomembno Za uporabo vložkov testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je treba lizat pripraviti s kompletom za lizo Xpert FFPE (kataloška št. GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Pomembno Test začnite v 30 minutah od dodajanja pripravljenega vzorca v vložek.

12.1 Priprava lizata FFPE

Pripravite lizat FFPE po navodilih za uporabo kompleta za lizo FFPE.

12.2 Priprava vložka

1. Vložek odstranite iz kartonske embalaže.
2. V Vortexu pripravite lizat FFPE 15 sekund pred uporabo.
3. Odprite pokrovček vložka.
4. S pipeto prenesite 520 µl lizata FFPE v komoro za vzorce vložka. (Opomba: lahko je prisotna majhna količina oborine, kar ne vpliva na uspešnost testa).

Preostali lizat FFPE shranite pri 2–8 °C ali ≤ –20 °C za morebitno ponovitev testa.



Slika 1. Vložek testa Xpert Breast Cancer STRAT4 (pogled od zgoraj)

5. Zaprite pokrovček vložka. Poskrbite, da se pokrovček dobro zapre.

12.3 Začetek testa

Pomembno Pred začetkom testa preverite, ali je v programsko opremo uvožena ustrezna datoteka za opredelitev testa (ADF) Xpert Breast Cancer STRAT4.

To poglavje navaja privzete korake za upravljanje s sistemom GeneXpert. Za podrobna navodila glejte *priročnik za uporabo sistema GeneXpert Dx* ali *priročnik za uporabo sistema GeneXpert Infinity*, odvisno od instrumenta, ki ga uporabljate.

Opomba Koraki, ki sledijo, so lahko drugačni, če je skrbnik sistema spremenil privzeti potek dela sistema.

1. Vključite instrument GeneXpert:

- Če uporabljate instrument GeneXpert Dx, najprej vklopite instrument GeneXpert Dx, nato vklopite računalnik. Samodejno se bo zagnala programska oprema GeneXpert, morda pa bo zahtevan dvoklik na ikono bližnjice za programsko opremo GeneXpert Dx na namizju Windows®.
- ali
- Če uporabljate instrument GeneXpert Infinity, vklopite instrument. Samodejno se bo zagnala programska oprema Xpertise, morda pa bo zahtevan dvoklik na ikono za programsko opremo Xpertise na namizju Windows.

2. Prijavite se v programsko opremo sistema instrumenta GeneXpert s svojim uporabniškim imenom in geslom. V oknu sistema GeneXpert kliknite **Ustvari test (Create Test)** (GeneXpert Dx) oziroma kliknite **Naročila (Orders)** in **Naroči test (Order Test)** Infinity. Odpre se okno Ustvari test (Create Test).
3. Skenirajte ali vtipkajte ID vzorca (Sample ID). Če vtipkate ID vzorca (Sample ID), preverite, ali ste jo vtipkali pravilno. ID vzorca je povezana z rezultati testa in je prikazana v oknu za ogledovanje rezultatov in vseh poročilih. Prikaže se pogovorno okno za skeniranje vložka.
4. Poskenirajte črtno kodo na vložku testa Xpert Breast Cancer STRAT4. Prikaže se okno Ustvari test (Create Test). Programska oprema z informacijami črtno kodo samodejno izpolni naslednja polja: Izberi test (Select Assay), ID serije reagentov (Reagent Lot ID), Serijska št. vložka (Cartridge SN).

5. Kliknite **Začni test (Start Test)** (GeneXpert Dx) ali **Predloži (Submit)** Infinity Če je potrebno, vnesite svoje geslo.
6. Za instrument GeneXpert Dx:
 - a) Odprite vrata modula instrumenta z utripajočo zeleno lučjo in naložite vložek.
 - b) Zaprite vrata. Test se začne izvajati, zelena luč pa preneha utripati. Ko je test končan, se luč izklopi.
 - c) Preden odprete vrata modula, počakajte, da sistem sprostí zaklepni mehanizem vrat. Odstranite vložek.
 - d) Uporabljene vložke odvrzite v ustrezne vsebnike za odpadne vzorce skladno s standardnimi praksami vaše ustanove. Glejte Razdelek 9.

ali

Na sistemu GeneXpert Infinity namestite vložek na transportni trak. Vložek se samodejno naloži, nato se izvede test, rabljeni vložek pa se prenese v vsebnik za odpadke.

13 Pregledovanje in tiskanje rezultatov

V tem poglavju so navedeni osnovni koraki za ogled in tiskanje rezultatov. Za podrobnejša navodila o tem, kako pregledovati in tiskati rezultate, glejte *priročnik za uporabo sistema GeneXpert Dx* ali *priročnik za uporabo sistema GeneXpert Infinity*, odvisno od instrumenta, ki ga uporabljate.

1. Kliknite na ikono **Pregledovanje rezultatov (View Results)** za ogled rezultatov.
2. Ko se test konča, kliknite **Poročilo (Report)** gumb v oknu Ogled rezultatov (View Results) in si ogledjte in/ali ustvarite datoteko s poročilom v obliki PDF.

14 Kontrola kakovosti

Vsak test vsebuje referenčno kontrolo genov (*CYFIP1*) in kontrolo preverjanja sonde (PCC).

- **CYFIP1 kontrola:** Ta referenčni gen se uporablja za normalizacijo ravni izražanja za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* in *MKI67*. Služi tudi kot kontrola ustreznosti vzorca (SAC), ki zagotavlja, da vzorec vsebuje zadostno RNA. Za veljaven rezultat testa je potreben vsaj signal *CYFIP1*. Signal *CYFIP1* pod minimalno količino ali negativni signal pomeni, da vzorec ne vsebuje dovolj RNA.
- **CYFIP1 alternativno (Alternate):** To je podvojena kontrola *CYFIP1*, ki se uporablja v algoritmu, kadar je prag delta cikla (dCt) *PGR* ali *MKI67* pod nastavitvijo mejne vrednosti testa. Za te cilje je potreben dodaten najmanjši nadomestni signal *CYFIP1*, da se zagotovi veljaven rezultat preskusa.
- **Kontrola za preverjanje sonde (PCC):** Pred začetkom PCR sistem instrumenta GeneXpert izmeri signal fluorescence sond, da tako spremlja rehidracijo kroglic, polnjenje reakcijske epruvete, celovitosti sonde in stabilnost barve. PCC je uspešen, če vzorec ustreza merilom sprejemljivosti.
- **Zunanje kontrole (ni priloženo):** Zunanje kontrole je treba uporabljati v skladu z zahtevami lokalnih, državnih in zveznih akreditacijskih organizacij, kot je ustrezno.

15 Tolmačenje rezultatov

Rezultate samodejno tolmači sistem instrumenta GeneXpert iz izmerjenih fluorescentnih signalov in vgrajenih algoritmov za izračune, jasno pa se jih prikaže v oknu Ogled rezultatov (View Results) v jezičku Testni rezultati (Test Results) in Analitični rezultati (Analyte Result). Testni rezultati (Test Results) in Analitični rezultati (Analyte Result) so prikazani tudi v testnem poročilu (Test Report). Vsi možni rezultati so prikazani v Preglednica 1 in Preglednica 2.

Preglednica 1. Vsi možni rezultati za test Xpert Breast Cancer STRAT4

Prikazani rezultati	CYFIP1	CYFIP1 alternativno (Alternate)	CIC
<i>ESR1</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>ESR1</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG

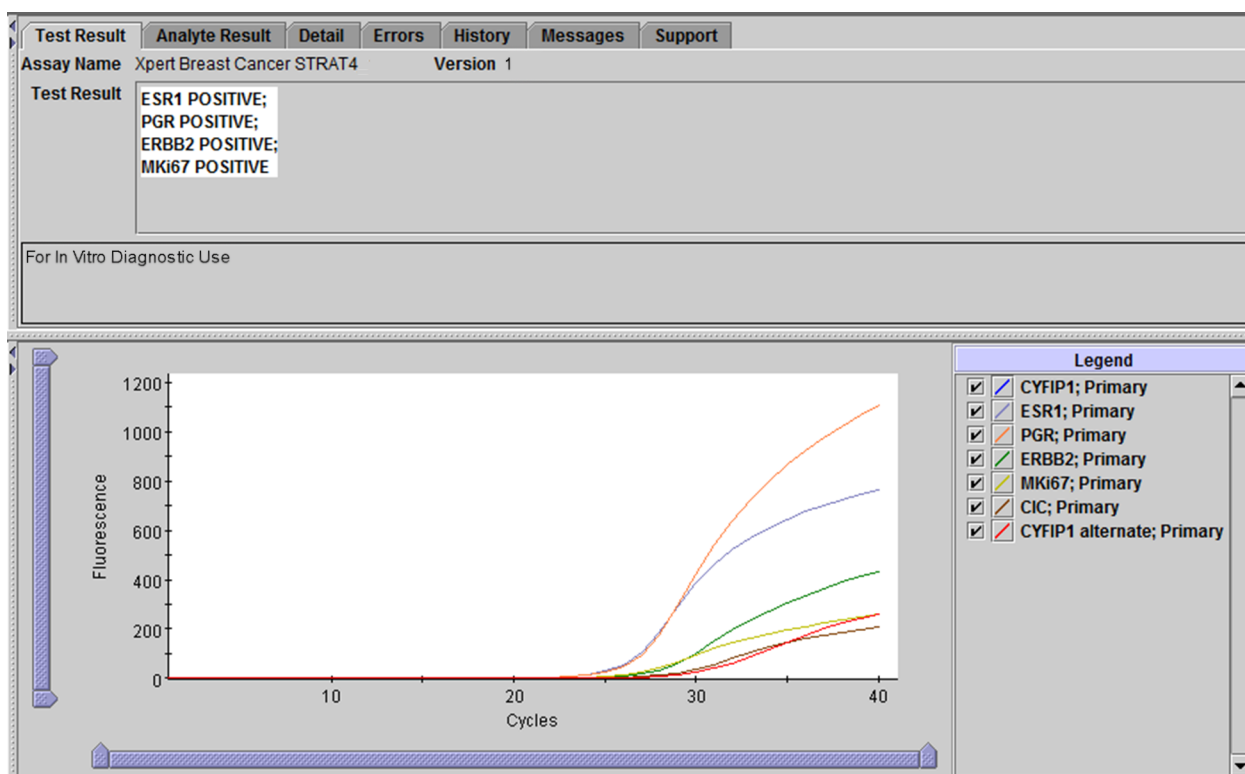
Prikazani rezultati	CYFIP1	CYFIP1 alternativno (Alternate)	CIC
<i>PGR</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>PGR</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS)	POZ (POS) ali NEG
<i>ERBB2</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>ERBB2</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>MKi67</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>MKi67</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS)	POZ (POS) ali NEG
<i>PGR</i> NEDOLOČLJIVO (INDETERMINATE)	USPEŠNO (PASS).	NEG	POZ (POS) ali NEG
<i>MKi67</i> NEDOLOČLJIVO (INDETERMINATE)	USPEŠNO (PASS).	NEG	POZ (POS) ali NEG
PONOVLJENI TEST (REPEAT TEST)	USPEŠNO (PASS).	POZ (POS) ali NEG	NEG
NEVELJAVEN (INVALID)	NEUSPEH (FAIL)	NEG	POZ (POS) ali NEG
NAPAKA (ERROR)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)
BREZ REZULTATA (NO RESULT)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)	BREZ REZULTATA (NO RESULT)

Preglednica 2. Reprezentativni rezultati in tolmačenje testa Xpert Breast Cancer STRAT4

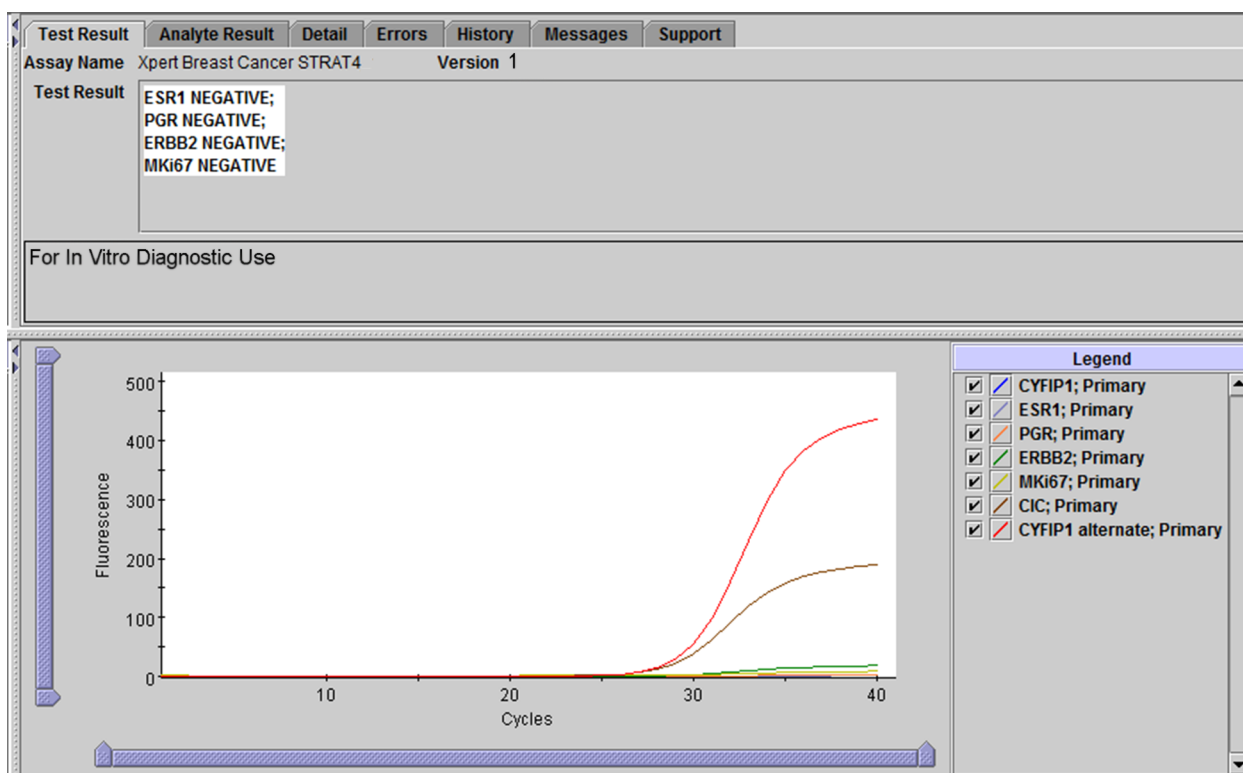
Rezultat	Tolmačenje
ESR1 POZITIVNO (POSITIVE) Glejte Slika 2.	• <i>ESR1</i> Transkripcija mRNA je preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) nad mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
PGR POZITIVNO (POSITIVE) Glejte Slika 2.	• <i>PGR</i> Transkripcija mRNA je preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) nad mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
ERBB2 POZITIVNO (POSITIVE) Glejte Slika 2.	• <i>ERBB2</i> Transkripcija mRNA je preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) nad mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
MKi67 POZITIVNO (POSITIVE) Glejte Slika 2.	• <i>MKi67</i> Transkripcija mRNA je preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) nad mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
ESR1 NEGATIVNO (NEGATIVE) Glejte Slika 3.	• <i>ESR1</i> Transkripcija mRNA ni preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) pod mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
PGR NEGATIVNO (NEGATIVE) Glejte Slika 3.	• <i>PGR</i> Transkripcija mRNA ni preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) pod mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • <i>CYFIP1</i> – alternativno - POZ (alternate - POS); <i>CYFIP1</i> in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
ERBB2 NEGATIVNO (NEGATIVE) Glejte Slika 3.	• <i>ERBB2</i> Transkripcija mRNA ni preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) pod mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.

Rezultat	Tolmačenje
MKi67 NEGATIVNO (NEGATIVE) Glejte Slika 3.	• <i>MKi67</i> Transkripcija mRNA ni preveč izražena in ima prag delta cikla (dCt) pod mejno vrednostjo. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • <i>CYFIP1</i> – alternativno - POZ (alternate - POS); <i>CYFIP1</i> in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
PGR nedoločljivo (Indeterminate) Glejte Slika 4.	• <i>PGR</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti, ker ni dovolj materiala vzorca. Test ponovite z bolj koncentriranim lizatom. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno - NEG (alternate - NEG); <i>CYFIP1</i> prag cikla (Ct) ni bil znotraj veljavnega razpona ali je bila končna točka pod nastavljenim pragom, potrebnim za določitev statusa PGR. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
MKi67 nedoločljivo (Indeterminate) Glejte Slika 4.	• <i>MKi67</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti, ker ni dovolj materiala vzorca. Test ponovite z bolj koncentriranim lizatom. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – NEG (alternate – NEG); <i>CYFIP1</i> prag cikla (Ct) ni bil znotraj veljavnega razpona ali je bila končna točka pod nastavljenim pragom, potrebnim za določitev statusa MKi67. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
PONOVLJENI TEST (REPEAT TEST) Glejte Slika 5.	• <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti. Preskus ponovite z uporabo alikvota shranjenega lizata vzorca FFPE. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> transkripcija mRNA je bila zaznana in ima prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona in končno točko nad nastavitvami praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – POZ/NEG (alternate – POS/NEG); <i>CYFIP1</i> zaznana je bila transkripcija mRNA. Transkripcija ima lahko prag cikla (Ct) znotraj veljavnega razpona ali izven njega in končno točko nad nastavljenim vrednostjo praga. • CIC – NEG; interna kontrola ima prag cikla (Ct) izven veljavnega razpona. • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.
NEVELJAVEN (INVALID)	• NEVELJAVNO (INVALID) <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti, ker ni dovolj materiala vzorca. Test ponovite z bolj koncentriranim lizatom. • <i>CYFIP1</i> – NEUSPEH (FAIL); <i>CYFIP1</i> prag cikla (Ct) ni bil znotraj veljavnega razpona ali je bila končna točka pod nastavljenim pragom. • <i>CYFIP1</i> – alternativno – NEG (alternate – NEG) <i>CYFIP1</i> prag cikla (Ct) ni bil znotraj veljavnega razpona ali je bila končna točka pod nastavljenim pragom • Preverjanje sonde – USPEŠNO (PASS); vsi rezultati testiranja sond so uspešni.

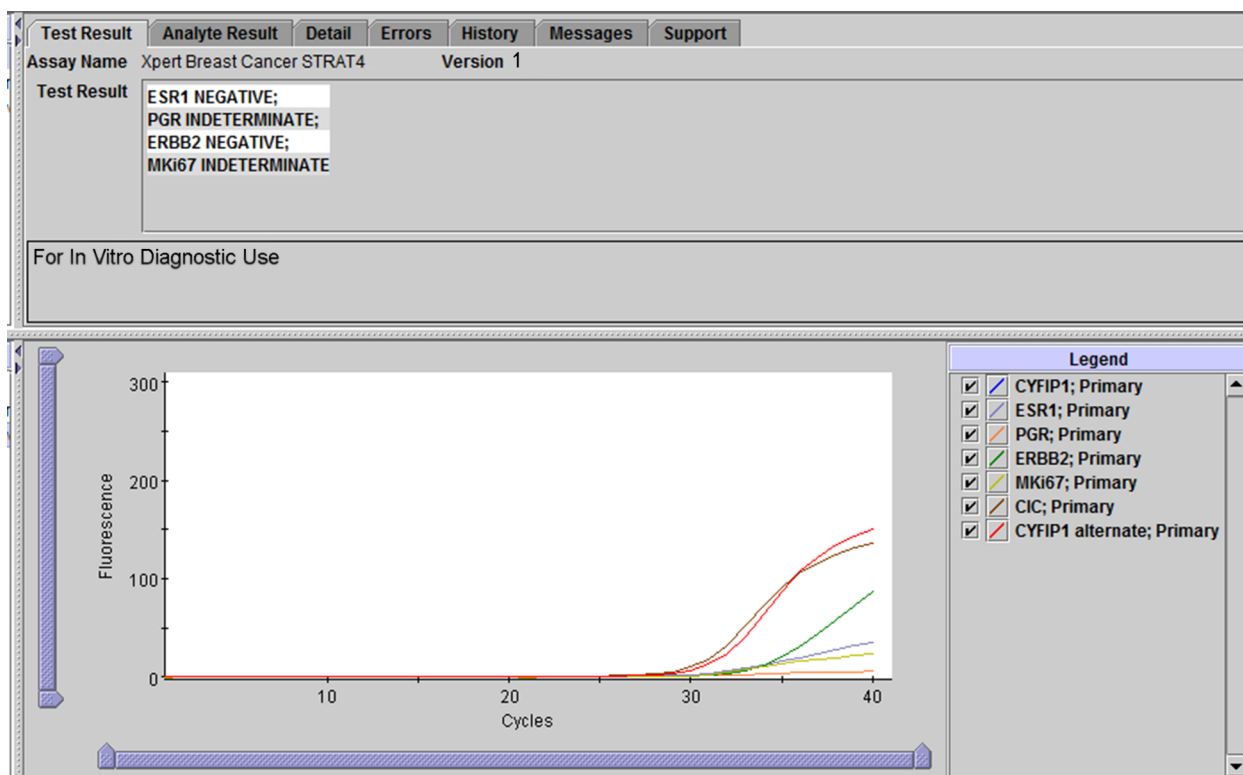
Rezultat	Tolmačenje
NAPAKA (ERROR)	• <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti. Preskus ponovite z uporabo alikvota shranjenega lizata vzorca FFPE. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NI REZULTATA (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativno – NI REZULTATA (alternate – NO RESULT) • Preverjanje sonde – USPEH*/NEUSPEH (PASS*/FAIL), vsi ali eden od rezultatov testiranja sond ni uspel. * Če je preverjanje sond uspešno, je napako povzročilo preseganje sprejemljivega razpona meje najvišjega tlaka, napaka prileganja krivulje ali okvara komponente sistema.
BREZ REZULTATA (NO RESULT)	• <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> Ravni izraženosti mRNA ni mogoče določiti. Za pridobitev rezultata testa je bilo zbranih premalo podatkov. Na primer, do tega lahko pride, če operator zaustavi testiranje, ki se je izvajalo. Preskus ponovite z zadržanim lizatom vzorca FFPE. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NI REZULTATA (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativno – NI REZULTATA (alternate – NO RESULT) • Preverjanje sonde – N/s (ni smiselno) (NA (not applicable))



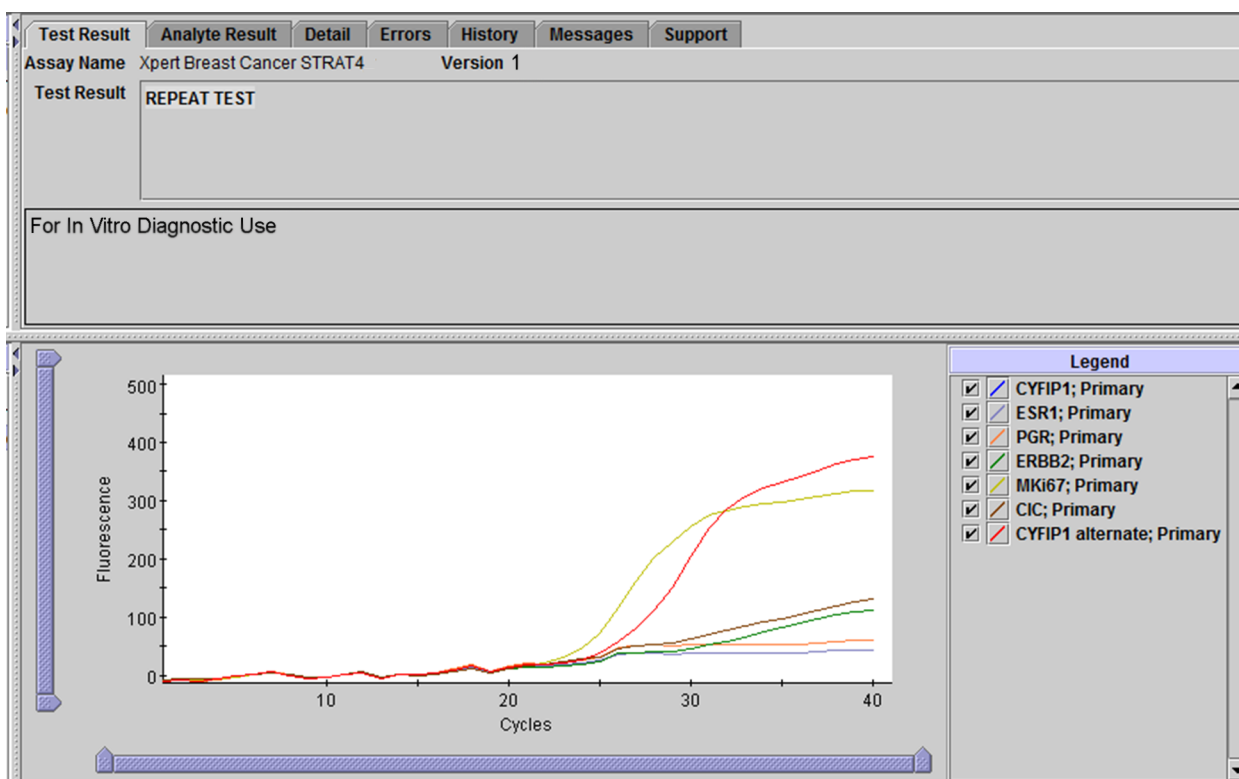
Slika 2. Okence za ogled rezultatov GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNO (POSITIVE)



Slika 3. Okence za ogled rezultatov GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNO (NEGATIVE)



Slika 4. Okence za ogled rezultatov GeneXpert Dx: PGR/MKi67 NEDOLOČLJIVO (INDETERMINATE)



Slika 5. Okence za ogled rezultatov GeneXpert Dx: PONOVLJENI TEST (REPEAT TEST)

16 Razlogi za ponovitev testa

Ponovite test z novim vložkom (vložka ne uporabite ponovno).

- Rezultat **PONOVITE TEST (REPEAT TEST)** označuje, da je bila interna kontrola neuspešna. Vzorec ni bil pravilno obdelan. V tem primeru ponovite test z uporabo novega 520 µl alikvota istega lizata FFPE.
- Rezultat **NEVELJAVNO (INVALID)** označuje, da je bila referenčna kontrola neuspešna. Vzorec ni bil pravilno obdelan, PCR je bil zaviran ali pa je bila kakovost RNK v tumorju, do katerega je imel dostop, nezadostna. V tem primeru ponovite test z bolj koncentriranim lizatom FFPE v skladu z navodili za uporabo kompleta za lizo FFPE.
- Rezultat **NAPAKA (ERROR)** pomeni, da kontrola za preverjanja sonde ni uspela in je bil test prekinjen, verjetno zaradi nepravilno napolnjene reakcijske epruvete ali je bila zaznana težava s celovitostjo sonde reagenta oziroma ker so bile presežene meje maksimalnega tlaka ali je bila zaznana napaka postavitve ventila. V tem primeru ponovite test z uporabo novega 520 µl alikvota istega lizata FFPE.
- Znak **BREZ REZULTATA (NO RESULT)** pomeni, da ni bilo zbranih dovolj podatkov. Na primer, operater je zaustavil testiranje, ki se je izvajalo, ali pa je prišlo do izpada napajanja. V tem primeru ponovite test z uporabo novega 520 µl alikvota istega lizata FFPE.
- Če zunanji QC ne deluje, kot se pričakuje, ponovite testiranje z zunanjo kontrolo in/ali se obrnite na družbo Cepheid.

17 Omejitve

- Spreminjanje teh postopkov lahko spremeni učinkovitost testa. Rezultate testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je treba tolmačiti skupaj z drugimi laboratorijskimi in kliničnimi podatki, dosegljivimi zdravniku.
- Učinkovitost testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je bila potrjena z uporabo postopkov, ki so navedeni v tem navodilu za uporabo, in z uporabo vzorcev FFPE, starih od pet do deset let.
- Učinkovitost testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je bila validirana samo s postopki, navedenimi v tem navodilu za uporabo.

- Napačni rezultati preskusov se lahko pojavijo zaradi neustreznega odvzema vzorcev, ravnanja z njimi, shranjevanja ali mešanja vzorcev. Da bi se izognili napačnim rezultatom, je treba natančno upoštevati navodila v tem dokumentu.
- Značilnosti delovanja niso bile ugotovljene pri bolnikih, mlajših od 25 let.
- Mutacije ali polimorfizmi v regijah, ki vežejo primer ali sondo, lahko povzročijo napačne, a verjetne rezultate za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* in *MKi67*.

18 Značilnosti učinkovitosti

18.1 Klinična učinkovitost

Značilnosti delovanja testa raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4 so bile ovrednotene na lokacijah v ZDA in EU glede na rezultate IHC za ER, PR, HER2 in Ki67 ter na fluorescenčno hibridizacijo *in situ* (FISH) za amplifikacijo genov HER2. Sprva je bilo v to študijo vključenih 211 deidentificiranih ostankov primerkov FFPE primarnih invazivnih tumorjev raka dojke iz ZDA in EU. 10 primerkov je bilo izključenih, ker je bilo na voljo premalo tumorja za testiranje, en primerek pa zaradi umaknjene soglasja. Tako je bilo na voljo skupno 200 primerkov za vključitev v analize podatkov. Za vsak primerek FFPE je bilo za testiranje z Xpert pripravljenih več stekelc; za IHC testiranje ER, PR, HER2 in Ki67; in za FISH testiranje amplifikacije gena HER2.

Skupaj je test Xpert Breast Cancer STRAT4 zagotovil veljavne rezultate v prvem poskusu testiranja za 99,5 % (199/200) primerkov. En vzorec, ki je na začetku pokazal nedoločen rezultat (**NAPAKA (ERROR), NEVELJAVNO (INVALID)** oziroma **BREZ REZULTATA (NO RESULT)**), je po eni sami ponovitvi testa dal rezultat. Skupni delež uspešnosti testa je bil 100,0 % (200/200).

Od 200 primerkov z veljavnimi rezultati testa Xpert sta ESR1 in ERBB2 100 % časa dala veljaven pozitiven ali negativen rezultat testa (200/200). Sistem Xpert je za PGR in MKi67 v 98,5 % (197/200) oziroma 97,0 % (194/200) primerov dal veljaven pozitiven oz. negativen rezultat testa. 7 vzorcev z nedoločljivimi rezultati Xpert za PGR in/ali MKi67 smo ponovno testirali z metodo koncentriranega lizata FFPE. Izvirni (prvi poskus) in rezultati ponovnega preizkusa so prikazani v Preglednica 3.

Za celoten nabor podatkov, vključno z rezultati ponovnega testa, je test Xpert Breast Cancer STRAT4 pokazal pozitivno odstotno ujemanje (PPA, Positive Percent Agreement) 97,2 %, negativno odstotno ujemanje (NPA, Negative Percent Agreement) 95,0 % in skupno odstotno ujemanje (OPA, Overall Percent Agreement) 97,0 % za ESR1 glede na IHC; ¹⁸PPA 88,4 %, NPA 90,7 % in OPA 88,9 % za PGR glede na IHC; ¹⁸PPA 100,0 %, NPA 92,4 % in OPA 93,3 % za ERBB2 glede na IHC; ¹⁹ in PPA 100 %, NPA 92,0 % in OPA 93,3 % za ERBB2 glede na HER2 FISH. ¹⁹ Za MKi67 PPA 88,8 % je bil NPA 100 % in OPA 90,7 % s pragom IHC nastavljenim na >20 % za pozitivno in <10 % za negativno. Vmesni vzorci MKi67 IHC (vključno z 10 %-20 % pragom) so bili izključeni iz analize. Skupni PPA, NPA in OPA za vsak cilj so prikazani v Preglednica 3.

Preglednica 3. Klinična učinkovitost

Primerjava	Nabor podatkov ^a	Skupaj (n) ^b	PPA	95-% IZ	NPA	95-% IZ	OPA	95-% IZ
ESR1/ER Xpert v primerjavi z IHC	Original	199	97,2 % (174/179)	93,6–98,8	100 % (20/20)	83,9–100	97,5 % (194/199)	94,3–98,9
	Ponovno testiranje	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 v primerjavi z IHC	Original	196	89,0 % (137/154)	83,0–93,0	92,9 % (39/42)	81,0–97,5	89,8 % (176/196)	84,8–93,3
	Ponovno testiranje	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 v primerjavi z IHC	Original	180	100 % (22/22)	85,1–100	92,4 % (146/158)	87,2–95,6	93,3 % (168/180)	88,7–96,1
	Ponovno testiranje	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 v primerjavi s FISH	Original	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1
	Ponovno testiranje	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1

Primerjava	Nabor podatkov ^a	Skupaj (n) ^b	PPA	95-% IZ	NPA	95-% IZ	OPA	95-% IZ
ERBB2/HER2 Xpert v primerjavi z IHC +FISH	Original	197	100 % (27/27)	87,5–100	91,2 % (155/170)	86,0–94,6	92,4 % (182/197)	87,8–95,3
	Ponovno testiranje	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 v primerjavi z IHC	Original	148	88,7 % (110/124)	81,9–93,2	100 % (24/24)	86,2–100	90,5 % (134/148)	84,7–94,3
	Ponovno testiranje	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 = 1 × lizat v skladu s priloženimi navodili; ponovni test = rezultat ponovnega testa na 4 × koncentriranem lizatu v primerjih, ko je originalni primerek (1 × lizat) dal nedoločljiv rezultat za PGR in/ali MKi67.

^b Primerki z nedoločenimi ali nedoločljivimi rezultati Xpert, vzorci z dvoumnimi ali vmesnimi rezultati IHC, vzorci z neuspešnim IHC in neuspešnim FISH so izključeni.

19 Analizna učinkovitost

19.1 Analitska občutljivost/minimalni vhodni test

Minimalni vhodni test je bil ugotovljen z oceno največjega CYFIP1 Ct (referenčnega gena), ki natančno določa vhodni vzorec, potreben za robustno izvedbo testa. Vhodni vzorec zagotavlja veljavnost rezultatov za večino testiranih kliničnih vzorcev FFPE. Vzorci z vrednostjo CYFIP1 Ct, večjo od dovoljene, ustvarijo **NEVELJAVEN (INVALID)** rezultat.

Analitska občutljivost/minimalni vhodni test za test raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4, opredeljen kot največji CYFIP1 Ct, ki ima ≥ 95 % veljavnih rezultatov, je bil ugotovljen z redčenimi lizati kliničnega vzorca FFPE za izzivni test CYFIP1 Ct. Za oceno občutljivosti CYFIP1 Ct je bil lizat kliničnega vzorca FFPE serijsko razredčen in testiran z N = 20 ponovitvami na stopnjo redčenja v 3 dneh, dokler ni bilo veljavnih ≤ 95 % rezultatov testa. Vrednosti redčenja so vključevale en primerek pri pričakovanem minimalnem vhodnem testu, dve ravni pod in dve ravni nad njim. Testiranje je bilo izvedeno na dveh serijah vložkov za test Xpert Breast Cancer STRAT4.

Pred začetkom študije je bila opravljena meja slepega testiranja z N = 60 ponovitvami z uporabo dveh neodvisnih serij vložkov testa Xpert Breast Cancer STRAT4. Omejitev slepega vzorca je sestavljala slepo parafinsko rezino (brez vzorca tkiva), vsi rezultati testa pa so pokazali pričakovane rezultate NEVELJAVNO (**NEVELJAVEN (INVALID)**). Serijske razredčitve kliničnega vhodnega vzorca tkiva FFPE pri 1/1000 so dale 20/20 veljavnih CyFIP1 Cts s povprečnimi Ct = 33,4 in 0,6 SD iz serije 1 testa za raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4in povprečnimi Ct = 33,6 in 0,5 SD iz serije 2. Nadaljnje razredčitve s poznejšimi vrednostmi CyFIP1 Ct niso dosegle ≥ 95 % veljavnih rezultatov, potrebnih za študijo. Preglednica 4 povzema število veljavnih preskusov na vsaki serijsko razredčeni vhodni ravni vzorca kot relativno razredčenje ali povprečno CYFIP1 Ct. Analitska občutljivost z dvema serijama vložkov testa raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4 je dokazala minimalno zahteva vhodnega testa za CYFIP1 Ct = 33,4. Ta vrednost v kombinaciji z variabilnostjo preskusa bi omogočila, da se določi zgornja meja CYFIP1 Ct = 35 za test raka dojke Xpert Breast Cancer STRAT4.

Preglednica 4. Minimalni vhodni test za Xpert Breast Cancer STRAT4

Serija kompleta	Vhodni vzorec (relativno redčenje)	Povprečje CYFIP1 Ct	SD	N veljavni tek (Ct ≤ 35)
00801 (serija 1)	1/20	27,6	0,4	20/20
	1/100	29,8	0,3	20/20
	1/1000	33,4	0,6	20/20
	1/2000	34,2	0,5	9/20
	1/4000	34,5	0,5	2/20
	NTC	n/s (ni smiselno)	n/s (ni smiselno)	0/20

Serija kompleta	Vhodni vzorec (relativno redčenje)	Povprečje CYFIP1 Ct	SD	N veljavni tek (Ct ≤ 35)
00903 (serija 2)	1/20	27,8	0,3	20/20
	1/100	30,0	0,3	20/20
	1/1000	33,6	0,5	20/20
	1/2000	34,2	0,4	9/20
	1/4000	34,6	0,0	1/20
	NTC	n/s (ni smiselno)	n/s (ni smiselno)	0/20

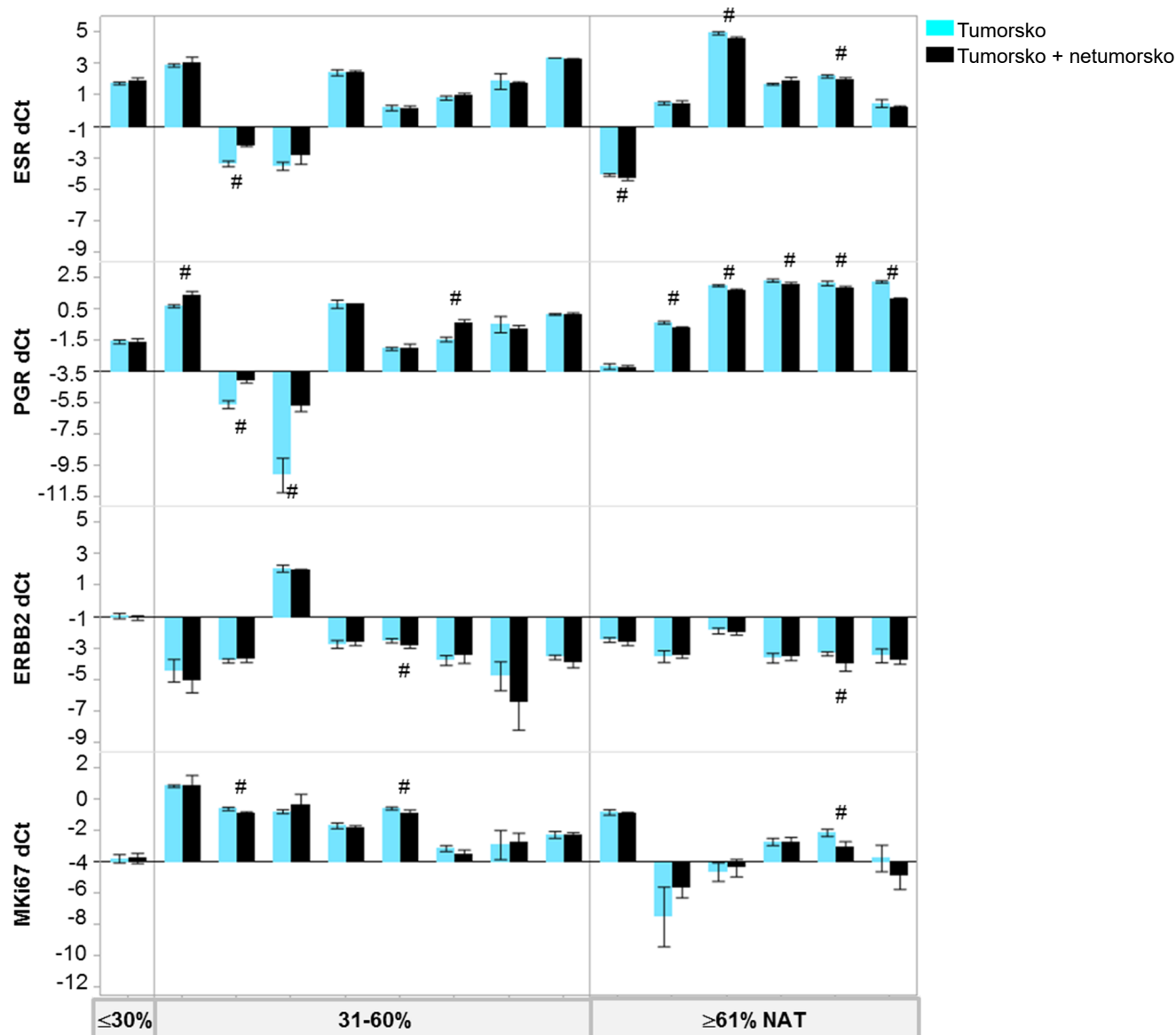
19.2 Interferenčno testiranje

Sosednje normalno/ne-tumorsko tkivo

Normalna sosednja (ne-tumorska) tkiva (NAT, Normal Adjacent (non-tumor) Tissue) so med vzorci tkiva dojke pogosto prisotna kot onesnaževala, ki lahko motijo določeno odkrivanje ciljev. Test Xpert Breast Cancer STRAT4 bo morda treba patološko potrditi z makro-disekcijo FFPE rezine tumorja dojke za zmanjšanje možnega učinka ne-tumorskih kontaminantov v zadevnih primerih, kot določi patolog. Za oceno učinka sosednjih normalnih/ne-tumorskih tkiv so s testom Xpert Breast Cancer STRAT4 testirali petnajst (15) FFPE blokov tkiva z invazivnim karcinomom dojke z makro disekcijo in brez nje, ki so vsebovali 21-98 % NAT. Testiranje Xpert Breast Cancer STRAT4 so izvedli z N = 4 ponovitvami istega lizata na pogoj. dCts ESR1, PGR, ERBB2 in MKi67 za vsak vzorec tkiva z makrodissekcijo (moder palični graf) ali brez makro disekcije (črn palični graf) so bili najprej ovrednoteni z enosmerno ANOVA za določitev statističnih motenj NAT. Za klinično značilno je vplivanje NAT veljalo, ko je bil vrednost ddCt (delta-delta Ct) med makro- in nemakro-diseciranimi vzorci > 1,0 in je bil rezultat testa spremenjen. Rezultati so povzeti v Slika 6.

dCts ESR1, PGR, ERBB2 in MKi67 za vseh 15 vzorcev so bili dani v skupine na podlagi % NAT (≤ 30 %, 31-60 % ali ≥ 61 %). Modri in črni palični grafikoni s SD predstavljajo povprečni ciljni dCts iz N = 4 ponovitev makro- in nemakro-diseciranih rezin FFPE bloka invazivnega raka dojke FFPE. Vseh 15 blokov FFPE (N = 1 pod 30 % NAT, N = 8 z 31-60 % NAT in N = 6 nad 60 % NAT) ni pokazalo nobene statistične značilnosti sosednjih normalnih/ne-tumorskih motenj tkiva na podlagi enosmerne analize ANOVA s p-vrednostjo ≥ 0,05; ali nobene klinične značilnosti (označeno z #), če je bila sprememba vrednosti delta Ct vsakega cilja med makro-diseciranimi ali nemakro-diseciranimi vzorci ≤ 1,0 ali če to ni vplivalo na ciljne rezultate testa (pozitivni, negativni).

Slika 6. Motnje sosednjega normalnega/netumorskega tkiva na ciljni dCts testa Xpert Breast Cancer STRAT4



DCIS, nekrotično, hemoragično tkivo

Za oceno učinka duktalnega karcinoma in situ (DCIS), nekrotičnih in hemoragičnih tkiv so s testom Xpert Breast Cancer STRAT4 z makro-disekcijo in brez makro-disekcije testirali skupaj 9 vzorcev tumorja dojke FFPE (3 bloki tumorjev dojke FFPE, ki vsebujejo 3-61 % DCIS, 3 bloki FFPE, ki vsebujejo 10-65 % nekrotičnega tkiva in 3 bloki FFPE, ki vsebujejo 15-41 % hemoragičnega tkiva). Testiranje Xpert Breast Cancer STRAT4 so izvedli z N = 4 ponovitvami istega lizata na pogoj. Za vse testne pogoje je bilo ugotovljeno, da nimajo nobenega statističnega ali klinično značilnega vpliva zaradi različnih kontaminacij z DCIS, nekrotičnim in hemoragičnim tkivom pri uporabi testa Xpert Breast Cancer STRAT4 (grafični podatki niso prikazani).

Človeška genomna DNA (hgDNA)

Za test Xpert Breast Cancer STRAT4 se uporabljajo visoko specifična polnila in sonde za učinkovito hibridizacijo s ciljnim predlogami mRNA za ESR1, PGR, ERBB2 in MKI67 iz nabora genomskih nukleinskih kislin (človeška genomna DNA = hgDNA). Za oceno učinka hgDNA na test Xpert Breast Cancer STRAT4 je bilo makrodisektiranih in testiranih 10 blokov tumorjev dojke FFPE z različnimi invazivnimi celicami duktalnega karcinoma z dodatkom 25 ng hgDNA in brez njega

v lizate vzorca FFPE z uporabo testa Xpert Breast Cancer STRAT4 pri N = 4 ponovitvah iz istega lizata na pogoj. Za vse testne pogoje je bilo ugotovljeno, da nimajo statističnega ali klinično značilnega vpliva na motenje hgDNA (grafični podatki niso prikazani).

19.3 Navzkrižno onesnaženje

Opravljen je bil študija, ki je pokazala, da samostojni vložki GeneXpert za enkratno uporabo minimalizirajo navzkrižno kontaminacijo zelo visoko pozitivnih vzorcev, ki v istem modulu GeneXpert sledijo negativnim vzorcem. Študijo je tvoril negativni vzorec, obdelan v istem modulu sistema GeneXpert, takoj po visoko pozitivnem vzorcu ESR1/PGR/ERBB2/MKi67. Negativni vzorec je tvorila *in vitro*-transkribirana (IVT) RNA, ki je vsebovala transkripcijo CYFIP1 s 5×10^4 kopijami za zagotovitev prisotnosti ciljnega referenčnega gena. Visoko pozitivni vzorec je tvorila IVT RNA, ki je vsebovala transkripcijo CYFIP1 s 5×10^5 kopijami, in IVT RNA, ki je vsebovala ESR1, PGR, ERBB2 in MKi67 s 5×10^6 kopijami, pripravljenih kot lizat FFPE. Shemo testiranja smo ponovili 41-krat z uporabo enega samega modula GeneXpert za skupno 20 visoko pozitivnih in 21 negativnih vzorcev. Vseh 20 visoko pozitivnih vzorcev je bilo pravilno poročanih kot ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNIH (POSITIVE), vseh 21 negativnih vzorcev pa pravilno kot ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNIH (NEGATIVE).

19.4 Ponovljivost in točnost testa

Ponovljivost testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je bila ocenjena s pomočjo nabora petih primerkov vzorcev lizata.

Pripravljeni so bili trije člani nabora z dodajanjem transkripcijske *in vitro* (IVT) RNA v pufer lize FFPE z dodanim ~2dCts mejnih vrednosti dCt za ESR1 (1 IVT RNA), PGR (2 IVT RNA) in ERBB2 (3 IVT RNA), z vrednostmi CYFIP1 Ct ~2-3 Cts od minimalne ravni vhodnega testa.

Dva člana nabora (4 klinični vzorci FFPE in 5 kliničnih vzorcev FFPE) je bilo ustvarjenih iz združenih kliničnih vzorcev FFPE v lizni pufer FFPE, kar je dalo vrednosti CYFIP1 Ct blizu minimalnega vhodnega testa, in mejne vrednosti dCt za vse cilje v razponu poročanja in v največjem možnem obsegu blizu mejni vrednosti testa dCt.

Dva operaterja na vsakem od treh študijskih mest sta v šestih testnih dneh testirala dva nabora s petimi vzorci na dan (pet vzorcev x šest dni x dva operaterja x dve ponovitvi x tri mesta). Testiranih je bilo 72 ponovitev na vzorec. Tri serije vložkov za test Xpert Breast Cancer STRAT4 so bile uporabljene za vsakega od treh centrov testiranja. Xpert Breast Cancer STRAT4 je bil izveden v skladu s postopkom v tem navodilu za uporabo.

Ponovljivost testa Xpert Breast Cancer STRAT4 je bila ovrednotena v smislu dCt za vsakega od štirih ciljev za vsak nabor. Povprečje, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (CV) med lokacijami, med serijami, med dnevi, med operaterji in znotraj testov za vsakega člana nabora so predstavljeni v Preglednica 5.

Preglednica 5. Povzetek podatkov ponovljivosti

Vzorec	Testni kanal (analit)	N ^a	Povprečje dCt	Med lokacijami		Med serijami		Med dnevi		Med operaterji		Znotraj testa		Skupno	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	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

Vzorec	Testni kanal (analit)	N ^a	Povprečje dCt	Med lokacijami		Med serijami		Med dnevi		Med operaterji		Znotraj testa		Skupno	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
Klinični vzorec 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
	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
Klinični vzorec 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 Rezultati z veljavnimi vrednostmi delta Ct med 72

20 Reference

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
2. Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC, International Agency for Research on Cancer) in Svetovna zdravstvena organizacija (SZO). GLOBOCAN 2012: Ocenjena globalna incidenca, umrljivost in razširjenost raka leta 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, Tüchler 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, Haerle 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. UREDBA (ES) št. 1272/2008 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju označevanja in pakiranju snovi in mešanic, ki spreminja in razveljavlja Seznam previdnostnih stavkov, direktivi 67/548/EGS in 1999/45/ES (ki spreminja uredbo (ES) št. 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 Kraji sedeža družbe Cepheid

Sedež družbe

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Sedež v Evropi

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Tehnična pomoč

Preden stopite v stik z oddelkom za tehnično podporo Cepheid, zberite naslednje informacije:

- Ime izdelka
- Številka serije
- Serijska številka instrumenta
- Sporočila o napakah (če so se prikazala)
- Različica programske opreme in, če je primerno, številko značke računalniškega servisa

Združene države Amerike

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

Francija

Telefon: + 33 563 825 319

E-naslov: support@cepheideurope.com

Informacije za stik z vsemi oddelki za tehnično podporo Cepheid so na voljo na naši spletni strani: www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Preglednica simbolov

Simbol	Pomen
	Kataloška številka
	<i>In vitro</i> diagnostični medicinski pripomoček
	Oznaka CE – skladnost z evropskimi predpisi
	Pooblaščen predstavnik v Evropski skupnosti
	Ne uporabiti ponovno
	Koda serije
	Glejte navodila za uporabo
	Svarilo
	Proizvajalec
	Država izdelave
	Dovolj snovi za <i>n</i> testov
	Kontrola
	Rok uporabe
	Omejitev temperature
	Biološka tveganja
	Pooblaščen predstavnik v Švici
	Uvoznik



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 Zgodovina revizij

Razdelek	Opis spremembe
V vseh	Izbrisani sklici programske opreme ONCore.