

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Brugsanvisning

IVD CE

Varemærke, patenter og erklæringer om ophavsret

Cepheid[®], Cepheid-logoet, GeneXpert[®] og Xpert[®] er varemærker tilhørende Cepheid registreret i USA og andre lande.

Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere.

KØBET AF DETTE PRODUKT GIVER KØBEREN DEN IKKE-OVERDRAGELIGE RET TIL AT BRUGE DET I OVERENSSTEMMELSE MED DENNE BRUGSANVISNING. INGEN ANDRE RETTIGHEDER FORMIDLES UDTRYKKELIGT, VED IMPLIKATIONER ELLER VED AFSKÆRELSE (ESTOPPEL). DESUDEN ER DER INGEN RETTIGHEDER TIL VIDERESALG VED KØB AF DETTE PRODUKT.

© 2017-2023 Cepheid.

En beskrivelse af ændringer kan findes i Revisionshistorik.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik

1 Handelsnavn

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Trivialnavn eller alment navn

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Tilsigtet brug

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en polymerasekædereaktion-baseret semikvantitativ analyse med kvalitative skæringsværdier for østrogenreceptor (*ESR1*), progesteronreceptor (*PGR*), human epidermal vækstfaktorreceptor 2 (*ERBB2/HER2*) og markør for proliferations-Ki-67-mRNA'er (*MKI67*) isoleret fra formalinfikseret paraffinindstøbt (FFPE) invasivt brystkræftvæv. RNA'et ekstraheres fra et tumorberiget område af et vævssnit til mikroskopi identificeret af en patolog. Testen anvendes i kombination med andre kliniske og laboratoriemæssige data til at klassificere brystkræftvæv med hensyn til deres hormonreceptorstatus, HER2-receptorstatus og proliferationsmarkørstatus. Testen er beregnet til at blive anvendt med GeneXpert[®]-systemet og omfatter isolering af RNA fra FFPE-væv såvel som amplifikation og påvisning af målsekvenser inden i kassetten.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er ikke beregnet som:

- En prädiktor af sygdomssværhedsgrad
- En selvstændig enhed til diagnostisk testning for brystkræft
- En prognostikator for sygdomsrecidiv

Indikationer: Testen er beregnet til brug til vurdering af mRNA-niveauerne af *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKI67* i invasive brystkræftvæv udtaget fra patienter og præpareret som FFPE-præparater, og som en hjælp til klinisk udredning i kombination med andre laboratedata.

4 Resumé og forklaring

Brystkræft er en af de hyppigste kræftformer hos kvinder verden over med cirka 1,7 millioner nye tilfælde af brystkræft hvert år.¹ I Europa diagnosticeres cirka 494.000 nye tilfælde hvert år, og 143.000 patienter vil dø af deres sygdom. I USA blev der diagnosticeret cirka 200.000 nye tilfælde af invasiv brystkræft i 2015.² Brystkræft er den hyppigste årsag til kræftdødelighed blandt kvinder i udviklingslande og den næsthypigste årsag til kræftdødelighed (efter lungekræft) blandt kvinder i udviklede lande.²

Hos kvinder er brystkræft den hyppigst diagnosticerede kræftform og den førende årsag til kræftdødsfald.¹ Brystkræftdødeligheden er faldet med 34 procent siden 1990 overvejende på grund af forbedret behandling og tidlig påvisning.³ Målinger af ER- og PR-proteinexpression er prognostiske for brystkræftudfald, og de forudsiger respons på tamoxifen og andre hormonelle terapier.^{4,5,6,7} HER2-overekspression betyder en dårlig prognose hos kvinder med brystkræft, men af større betydning er det, at respons på trastuzumab eller andre HER2-targeterede terapier kan forudsiges på grundlag af HER2- (*ERBB2*-) proteinoverekspression eller HER2-genamplifikation.⁸ Markør for Ki-67-proliferation (*MKI67*) er blevet undersøgt i vid udstrækning i retrospektive undersøgelser, der involverede brystkræftpatienter⁹ og betragtes som en vigtig indikator for behovet for kemoterapi.¹⁰ Metaanalyser har vist, at den er associeret med værre overlevelsesudfald ved tidlig brystkræft.¹¹ I betragtning af disse markørers betydning for valg af et effektivt

behandlingsregime for en patient med brystkræft anbefaler behandlingsretningslinjerne fra Det europæiske selskab for medicinsk onkologi (ESMO), at alle primære brystkarcinomer testes for ER, PR, HER2 (ERBB2) og Ki67 ved diagnosetidspunktet.¹²

Immunhistokemi (IHC) anvendes hyppigt til måling af ER-, PR-, HER2- og Ki67-proteinekspression. For HER2-ekspression er IHC typisk den første test, der udføres, og resultaterne rapporteres på en skala fra 0 til 3+. Hvis resultatet er tvetydigt for HER2-ekspression (2+), reflekteres prøven i en HER2-in situ hybridiserings- (ISH-) analyse, f.eks. fluorescens in situ hybridisering (FISH) eller kromogen in situ hybridisering (CISH), der undersøger for HER2-genamplifikation.¹³ Sammenligninger på tværs af laboratorier har vist en høj grad af variabilitet i resultater for IHC og ISH, som overvejende skyldes forskelle i de antistoffer, der anvendes til IHC, såvel som subjektivitet med hensyn til fortolkningsmetoder.¹⁴

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en test til in vitro-diagnostik, der anvendes til at bestemme mRNA-ekspressionsniveauerne af *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67* isoleret fra FFPE-præparater af invasiv brystkræftvæv.

Analysen udføres i en selvstændig kassette efter et kort trin til klargøring af prøvelysat uden for instrumentet, og den kræver mindre end 15 minutters praktisk håndtering med en samlet behandlingstid på mindre end 2 timer.

5 Procedurens princip

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en reel polymerase-kædereaktion- (PCR-) analyse til påvisning af *ESR1*-, *PGR*-, *ERBB2*- og *MKi67*-mRNA'er isoleret fra formalinfikseret paraffinindstøbt (FFPE) invasivt brystvæv. Analysen udføres på Cepheid GeneXpert-instrumentsystemerne. GeneXpert-instrumentsystemerne automatiserer og integrerer prøveoprensning, nukleinsyreamplifikation og påvisning af målsekvenserne i enkle eller komplekse prøver ved hjælp af reel RT-PCR. Systemerne består af et instrument, en strekkodescanner, en computer og forudinstalleret software til at køre tests og vise resultaterne. Systemerne kræver, at der bruges GeneXpert-kassetter til engangsbrug, som indeholder RT-PCR-reagenserne og udfører RT-PCR-processen. For en fuld beskrivelse af systemerne henvises til den relevante betjeningsvejledning til GeneXpert-instrumentsystemet.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen omfatter reagenser til samtidig påvisning af *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, et cytoplasmisk FMR1-interagerende protein 1- (*CYFIP1*-) referencegen, en intern RT-PCR-kontrol (*CIC*) og en intern probekontrol (*PCC*). Referencegenet verificerer præparatillstrækkelighed og anvendes til at normalisere mRNA-ekspressionsniveauerne for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*. Den interne RT-PCR-kontrol (*CIC*) anvendes til at verificere, at RT-PCR-reaktionen udføres korrekt. *PCC* verificerer rehydrering af reagensperler, fyldning af RT-PCR-rør, probeintegritet og farvestofstabilitet i kassetten. Analysen benytter i alt seks distinkte fluorescenskanaler til påvisning af mål eller kontrol/reference, hver med sine egne skæringsparametre for gyldighed af mål/kontrol/reference.

FFPE-prøver skal først behandles med Xpert® FFPE-lysis kittet ved at klargøre et 4-5 µm (mikron) tykt vævssnit, hvor FFPE-vævet om nødvendigt først makrodissekeres for at berige området med invasiv tumor, hvorefter det skræbes og placeres i et rør sammen med de anbefalede volumener af FFPE-lysisreagens og proteinase K. Opløsningen inkuberes derefter i en varmeblok ved 80 °C i 30 minutter. Efterfølgende blandes ethanol med prøven, og det anbefalede volumen af det klargjorte prøvelysat tilsættes derefter direkte til en testkassette. Testkassetten sættes i et modul af et GeneXpert-instrumentsystem, hvor nukleinsyreoprensning, amplifikation og påvisning i realtid alt sammen er fuldautomatiseret og fuldstændig integreret af systemet. Alle reagenser, der skal bruges til prøveklargøring på instrumentet og RT-PCR-analyse er forudisat i kassetten. Nukleinsyrer i lysatet opfanges på et filter, vaskes og elueres ved sonikering. Den oprensede nukleinsyre blandes derefter med tørre RT-PCR-reagenser, og opløsningen overføres til reaktionsrøret til RT-PCR og påvisning. Der går cirka 75 minutter, til der foreligger et resultat i GeneXpert.

De skæringsværdier for påvisning, som Xpert Breast Cancer STRAT4-testen bruger i hver fluorescenskanal blev fastlagt med henblik på at maksimere positiv, negativ og samlet overensstemmelse i procent sammenlignet med referencelaboratoriets IHC- eller IHC/FISH-resultater for hvert mål. IHC for ER, PR, Ki67 og HER2 såvel som FISH for HER2 blev behandlet og scoret i henhold til anvisningerne i brugsanvisningen. Fortolkning af -resultater blev udført i henhold til retningslinjerne fra ASCO/CAP 2013.¹⁵ Tumorer blev klassificeret som ER- eller PRIHC-positiv, når $\geq 1\%$ af invasive tumorceller viste tydelig nukleær farvning, uanset farvningens intensitet. HER2-ekspression blev evalueret med HercepTest- (IHC-) kittet (Dako) og scoret som 0, 1+, 2+ eller 3+. Tumorer scoret som 2+ blev reflekteret i HER2 FISH ved anvendelse af PathVysion HER2 DNA-probekittet (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Tilfælde blev betragtet som HER2-positiv, hvis de blev scoret 3+ ved IHC og/eller amplificeret ved FISH (defineret som HER2:CEP17 (forhold $\geq 2,0$), og/eller gennemsnitligt antal HER2-kopier $\geq 6,0$ signaler/celle i henhold til den opdaterede 2013 ASCO/CAP-retningslinje for klinisk praksis vedrørende HER2-testning for brystkræft.¹⁵ For Ki67 blev tumorer klassificeret som positiv (høj), når $\geq 20\%$ af invasive tumorceller viste tydelig nukleær farvning, uanset farvningens intensitet.

Med hensyn til referencegenkontrollen og den interne RT-PCR-kontrol, definerer skæringsværdierne for påvisning områder af minimum og maksimum PCR-værdier for cyklustærskel (Ct), der bestemmer et gyldigt resultat, et adækvat minimum prøveinput og ingen PCR-hæmning. Med hensyn til ESR1-, PGR-, ERBB2- og MKi67-målene defineres skæringsværdierne for påvisning af delta-cyklustærskelværdier (dCt-værdier) (referencegen-Ct minus målgen-Ct), der bestemmer POSITIVE (POSITIVE) vs. NEGATIVE (NEGATIVE) resultater for et givet mål i en kanal.

6 Reagenser og instrumenter

6.1 Medfølgende materiale

Xpert Breast Cancer STRAT4-kittet indeholder tilstrækkeligt med reagenser til at behandle 10 kvalitetskontrolprøver eller FFPE-lysater klargjort med Xpert FFPE Lysis Kit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Xpert Breast Cancer STRAT4-kittet indeholder følgende artikler:

Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter med integrerede reaktionsrør	10
<ul style="list-style-type: none"> • Perle 1, 2 og 3 (frysetørrede) • Skyllereagens • Elueringsreagens 	<ul style="list-style-type: none"> 1 pr. kassette 1,0 ml pr. kassette 2,0 ml pr. kassette
CD	1 pr. kit
<ul style="list-style-type: none"> • Analysedefinitionsfil (ADF) • Brugsanvisning • ONCore-rapportfiler 	

Bemærk Sikkerhedsdatablade (SDS) er tilgængelige på www.cepheid.com eller www.cepheidinternational.com under fanebladet **ASSISTANCE (SUPPORT)**.

Bemærk Det bovine serumalbumin (BSA) i perlerne i dette produkt blev produceret og fremstillet udelukkende af bovint plasma fra USA. Intet drøvtyggerprotein eller andet animalsk protein blev fodret til dyrene; dyrene bestod test før og efter slagtning. Under behandlingen var der ingen sammenblanding af materialet med andre animalske materialer.

7 Opbevaring og håndtering

- Xpert Breast Cancer STRAT4-kittets indhold skal opbevares ved 2–28 °C.
- Åbn ikke låget på kassetten, før du er klar til udføre testen.
- Anvend kassetten inden for 30 minutter efter åbning af låget.
- Brug ikke en kassette, der er lækket.

8 Materialer, der kræves, men ikke medfølger

- Xpert FFPE-lysiskit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10) til klargøring af FFPE-lysate. Dette kit består af FFPE-lysisreagens, proteinase K (PK), 1,5 ml rør og 5 ml hætteglas.
- Vortexmixer
- Pipetter og pipettespidser med aerosolfilter, der er egnede til at pipettere 600 µl, 1,2 µl og 520 µl.
- Computer med ophavsretligt beskyttet GeneXpert-software version 4.7b eller senere eller Xpertise version 6.4b eller senere, stregkodescanner og relevant betjeningsvejledning til GeneXpert-instrumentsystemet.
- Printer: Hvis en printer er påkrævet, skal du kontakte Cepheids tekniske support for at arrangere køb af en anbefalet printer.

9 Advarsler og forholdsregler

- Kun til *in vitro*-diagnostik.
- Alle biologiske prøver skal behandles som værende i stand til at overføre smitstoffer. Alle humane prøver skal behandles med brug af standardforholdsregler. Retningslinjer for præparathåndtering er tilgængelige hos Verdenssundhedsorganisationen eller USA's Centers for Disease Control and Prevention (Centre for sygdomsbekæmpelse og -forebyggelse).
- Følg din institutions sikkerhedsprocedurer for arbejde med kemikalier og håndtering af biologiske prøver.
- Testens ydeevneegenskaber er kun blevet fastlagt med den præparatype, der er anført i Afsnit 3. Denne analyses ydeevne med andre præparatyper eller prøver er ikke blevet evalueret.
- FFPE-væv skal behandles med Xpert FFPE-lysiskit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Ufuldstændig fjernelse (skrabning) af tumorområdet fra objektglasset til klargøring af FFPE-lysatsat kan resultere i utilstrækkeligt materiale til analysen og derfor en højere rate af ikke-bestemmelige/ugyldige resultater end forventet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.
- Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetelåget må ikke åbnes, bortset fra ved tilsætning af klargjort FFPE-lysatsat.
- Brug ikke en kassette, der har været tabt, efter den er taget ud af emballagen.
- Ryst ikke kassetten. Hvis kassetten rystes eller tabes efter åbning af kassetelåget, kan det give ugyldige resultater.
- Brug ikke en kassette med et beskadiget reaktionsrør.
- Hver Xpert Breast Cancer STRAT4-kassette til engangsbrug anvendes til at behandle én test. Genanvend ikke brugte kassetter.
- Brug ikke en kassette, hvis den ser ud til at være våd, eller, hvis forseglingen på låget ser ud til at være brudt.
- Anbring ikke etiketten med prøve-ID på kassetelåget eller på stregkodeetiketten.
- God laboratoriepraksis, herunder skift af handsker mellem håndtering af patientpræparater, anbefales for at undgå kontaminering af præparater eller reagenser.
- Søg vejledning fra personale ansvarligt for miljøaffald på din institution vedrørende bortskaffelse af brugte beholdere og ubrugte reagenser. Læs statslige, territoriale eller lokale forordninger, da disse kan adskille sig fra nationale forordninger. Dette materiale kan udvise egenskaber svarende til farligt affald, der skal bortskaffes ifølge specifikke procedurer. Institutioner skal overholde deres krav til bortskaffelse af farligt affald.

10 Kemiske farer^{16,17}

I henhold til det globale harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) anses dette materiale ikke som farligt.

11 Præparattagning, -transport og -opbevaring

- Må kun anvendes med FFPE-præparater behandlet med Xpert FFPE Lysis Kit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Følg ASCO/CAP-retningslinjer¹⁵ for klargøring af FFPE-væv.
- FFPE-lysatsat skal klargøres fra FFPE-tumorblokken med det største område af levedygtigt brystkarcinom (mindst 30 % tumorcellularitet), og om nødvendigt skal der udføres manuel makrodissektion før testning i Xpert Breast Cancer STRAT4-testen. For tumorprøver, der er mindre end 10 mm² og har mindre end 30 % tumor, kan det være nødvendigt at anvende proceduren med koncentreret lysatsat eller flere end et 4-5 µm snit for at opnå gyldige resultater..
- FFPE-lysatsat skal transporteres til laboratoriet ved 2-8 °C.
- FFPE-lysatsat er stabilt i op til 1 uge ved 2-8 °C eller i 4 uger ved ≤ -20 °C før testning med Xpert Breast Cancer STRAT4. Opbevares ved -80 °C ved langtidsopbevaring. Der anbefales højst 1 gangs frysning-optøning. Optø FFPE-lysatsat til stuetemperatur, og vortex det i 15 sekunder før brug.

12 Procedure

Vigtigt Anvendelse af Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetten kræver klargøring af et lysatsat ved hjælp af Xpert FFPE-lysiskittet (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Vigtigt Start analysen inden for 30 minutter, efter den klargjorte prøve er tilsat til kassetten.

12.1 Klargøring af FFPE-lysatet

Klargør FFPE-lysatet i henhold til FFPE-lysis kittets brugsanvisning.

12.2 Klargøring af kassetten

1. Tag kassetten ud af kartonemballagen.
2. Vortex klargjort FFPE-lysat 15 sekunder før brug.
3. Åbn kassettelåget.
4. Brug en pipette til at overføre 520 µl FFPE-lysat til kassettsens prøvekammer. (Bemærk: Der kan være en lille mængde udfældning til stede, hvilket ikke påvirker analysegydeevnen).

Opbevar tilbageværende FFPE-lysat ved 2-8 °C eller ≤ -20 °C i tilfælde af gentest.



Figur 1. Xpert Breast Cancer STRAT4-kassette (set ovenfra)

5. Luk kassettelåget. Sørg for, at låget sidder godt fast.

12.3 Start af testen

Vigtigt Inden testen startes, skal det sikres, at analysedefinitionsfilen (ADF) for Xpert Breast Cancer STRAT4 er importeret til softwaren.

Dette afsnit indeholder en liste over standardtrinnene til betjening af GeneXpert-systemet. Du kan finde detaljerede anvisninger i *betjeningsvejledningen til GeneXpert Dx-systemet* eller i *betjeningsvejledningen til GeneXpert Infinity-systemet*, afhængigt af hvilket instrument der bruges.

Bemærk De trin, du skal følge kan være nogle andre, hvis systemadministratoren har ændret systemets standardarbejdsproces.

1. Tænd for GeneXpert-instrumentet:
 - Hvis du bruger GeneXpert Dx-instrumentet, skal du først tænde GeneXpert Dx-instrumentet og dernæst tænde computeren. GeneXpert-softwaren starter automatisk eller kan kræve, at du dobbeltklikker på GeneXpert Dx-softwareikonet på Windows®-skrivebordet.
 - eller
 - Hvis du bruger GeneXpert Infinity-instrumentet, skal du tænde instrumentet. Xpertise-softwaren starter automatisk eller kan kræve, at du dobbeltklikker på Xpertise-softwareikonet på Windows-skrivebordet.
2. Log på GeneXpert instrumentsystem-softwaren ved hjælp af dit brugernavn og din adgangskode. I GeneXpert-systemvinduet skal du klikke på **Opret test (Create Test)** (GeneXpert Dx) eller klikke på **Bestillinger (Orders)** og **Bestil test (Order Test)** (Infinity). Vinduet Opret test (Create Test) åbnes.
3. Scan eller skriv prøve-id'et (Sample ID). Hvis du indtaster prøve-id'et (Sample ID), skal du sørge for, at prøve-id'et (Sample ID) er indtastet korrekt. Prøve-ID'et (Sample ID) er knyttet til testresultaterne og vises i vinduet Vis resultater (View Results) og alle rapporter. Dialogboksen Scan kassette (Scan Cartridge) vises.

4. Scan stregkoden på Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetten. Vinduet Opret test (Create Test) vises. Ved hjælp af stregkodeoplysningerne udfylder softwaren automatisk kasserne for de følgende felter: Væg analyse (Select Assay), Reagens-parti-ID (Reagent Lot ID), Kasette-SN (Cartridge SN).
5. Klik på **Start test (Start Test)** (GeneXpert Dx) eller **Submit (Indsend)** (Infinity). Indtast dit kodeord, hvis du bliver bedt om det.
6. På GeneXpert Dx-instrumentet:
 - a) Åbn instrumentmodullågen med det blinkende grønne lys og indsæt kassetten.
 - b) Luk lågen. Testen starter og det grønne lys holder op med at blinke. Når testen er slut, slukker lyset.
 - c) Vent med at åbne modullågen indtil systemet frigiver lågelåsen. Fjern kassetten.
 - d) Bortskaf brugte kassetter i den relevante præparataffaldsbeholder i henhold til din institutions standardpraksis. Se Afsnit 9.

eller

På GeneXpert Infinity-systemet, skal du anbringe kassetten på transportbåndet. Kassetten bliver ført ind automatisk, testen kører og den brugte kassette bliver anbragt i affaldsbeholderen.

13 Visning og udskrivning af testresultater

I dette afsnit vises de grundlæggende trin til visning og udskrivning af resultater. Du kan finde mere detaljerede anvisninger om, hvordan du får vist og udskriver resultaterne i *Betjeningsvejledningen til GeneXpert Dx-systemet* eller i *Betjeningsvejledningen til GeneXpert Infinity-systemet*, afhængigt af hvilket instrument, der bruges.

1. Klik på ikonet **Vis resultater (View Results)** for at få vist resultater.
2. Når testen er fuldført, skal du klikke på knappen **Rapport (Report)**. Når testen er fuldført, skal du klikke på knappen Rapport (Report) i skærmen Vis resultater (View Results) for at få vist og/eller generere en rapport i PDF-format.

Bemærk

Hvis ONCore-softwaren anvendes til at generere en rapport, henvises til brugervejledningen til GeneXpert ONCore-softwaren på CD'en med brugervejledning til ONCore for anvisninger i at oprette en rapport. Se også anvisningerne for ONCore-rapporter på Xpert Breast Cancer STRAT4-CD'en for anvisninger i fortolkning af ONCore-rapporten for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.

14 Kvalitetskontrol

Hver test indeholder en referencegenkontrol (*CYFIP1*) og en probekontrol (PCC).

- **CYFIP1-kontrol:** Dette referencegen anvendes til at normalisere ekspressionsniveauerne for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*. Det fungerer også som en prøvetilstrækkelighedskontrol (SAC), der sikrer, at prøven indeholder tilstrækkeligt RNA. Et gyldigt testresultat kræver et *CYFIP1*-minimumssignal. Et *CYFIP1*-signal under minimumsmængden eller et negativt signal angiver, at prøven ikke indeholder tilstrækkeligt RNA.
- **CYFIP1-alternativ:** Dette er et *CYFIP1*-kontrolduplikat, der anvendes i algoritmen, når delta-cyklustærsklen (dCt) for *PGR* eller *MKi67* er under indstillingen for analysens skæringsværdi. For disse mål er et yderligere minimumt *CYFIP1*-alternativsignal nødvendigt for at sikre et gyldigt testresultat.
- **Probekontrol (PCC):** Inden starten af PCR måler GeneXpert-instrumentsystemet fluorescenssignalet fra prøberne for at overvåge rehydrering af perler, fyldning af reaktionsrør, probeintegritet og farvestofstabilitet. PCC består, hvis den opfylder de validerede acceptkriterier.
- **Eksterne kontroller (medfølger ikke):** De eksterne kontroller skal bruges i overensstemmelse med kravene fra relevante lokale, statslige og føderale akkrediteringsorganisationer.

15 Fortolkning af resultater

Resultaterne fortolkes automatisk af GeneXpert-instrumentsystemet ud fra målte fluorescenssignaler og indlejrede beregningsalgoritmer og vises tydeligt i vinduet Vis resultater (View Results) på fanerne Testresultater (Test Results) og Analytresultat (Analyte Result). Testresultat (Test Result) og Analytresultater (Analyte Results) vises også på Testrapport (Test Report). De mulige resultater vises i Tabel 1 and Tabel 2.

Tabel 1. Alle mulige resultater for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen

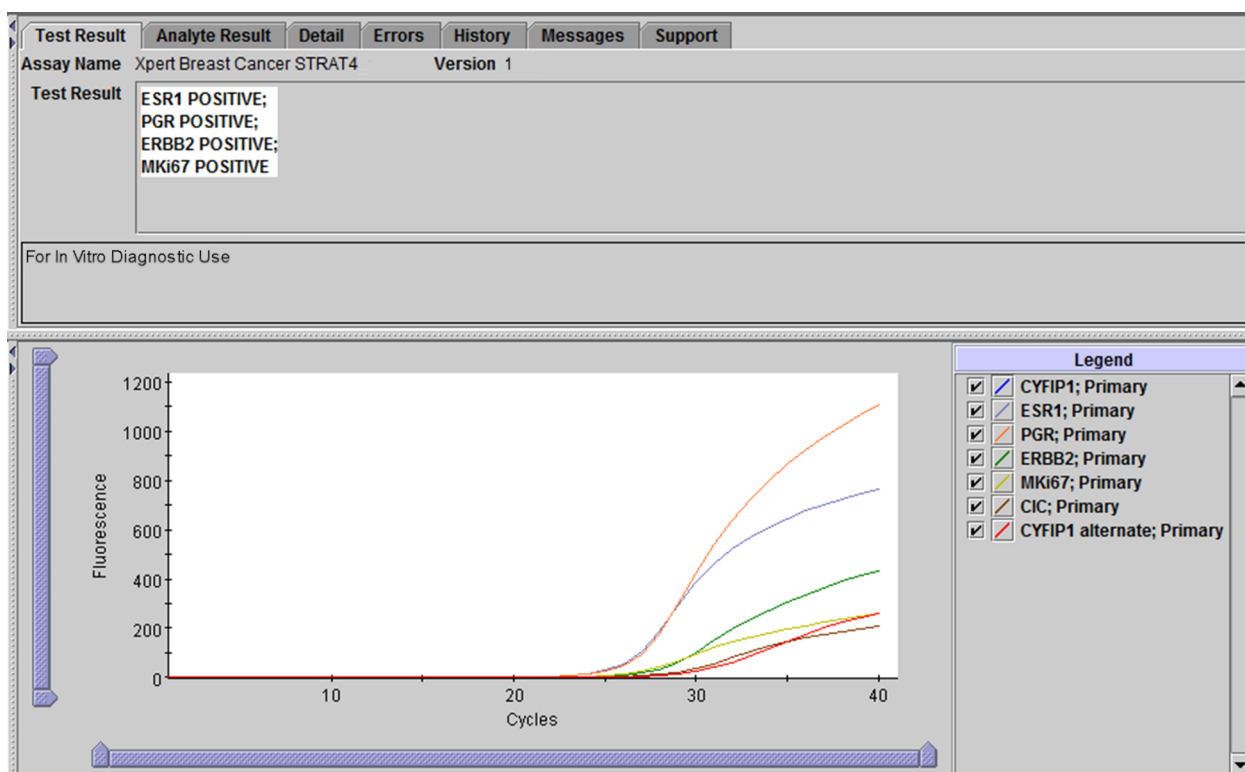
Vist resultat	CYFIP1	CYFIP1-alternativ	CIC
<i>ESR1</i> -POSITIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>ESR1</i> -NEGATIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>PGR</i> -POSITIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>PGR</i> -NEGATIV	BESTÅET (PASS)	POS	POS. eller NEG.
<i>ERBB2</i> -POSITIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>ERBB2</i> -NEGATIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>MKi67</i> -POSITIV	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	POS. eller NEG.
<i>MKi67</i> -NEGATIV	BESTÅET (PASS)	POS	POS. eller NEG.
<i>PGR</i> -UBESTEMMELIG	BESTÅET (PASS)	NEG	POS. eller NEG.
<i>MKi67</i> -UBESTEMMELIG	BESTÅET (PASS)	NEG	POS. eller NEG.
GENTAG TEST (REPEAT TEST)	BESTÅET (PASS)	POS. eller NEG.	NEG
UGYLDIG (INVALID)	MISLYKKET (FAIL)	NEG	POS. eller NEG.
FEJL (ERROR)	INTET RESULTAT (NO RESULT)	INTET RESULTAT (NO RESULT)	INTET RESULTAT (NO RESULT)
INTET RESULTAT (NO RESULT)	INTET RESULTAT (NO RESULT)	INTET RESULTAT (NO RESULT)	INTET RESULTAT (NO RESULT)

Tabel 2. Repræsentative resultater og fortolkning af Xpert Breast Cancer STRAT4

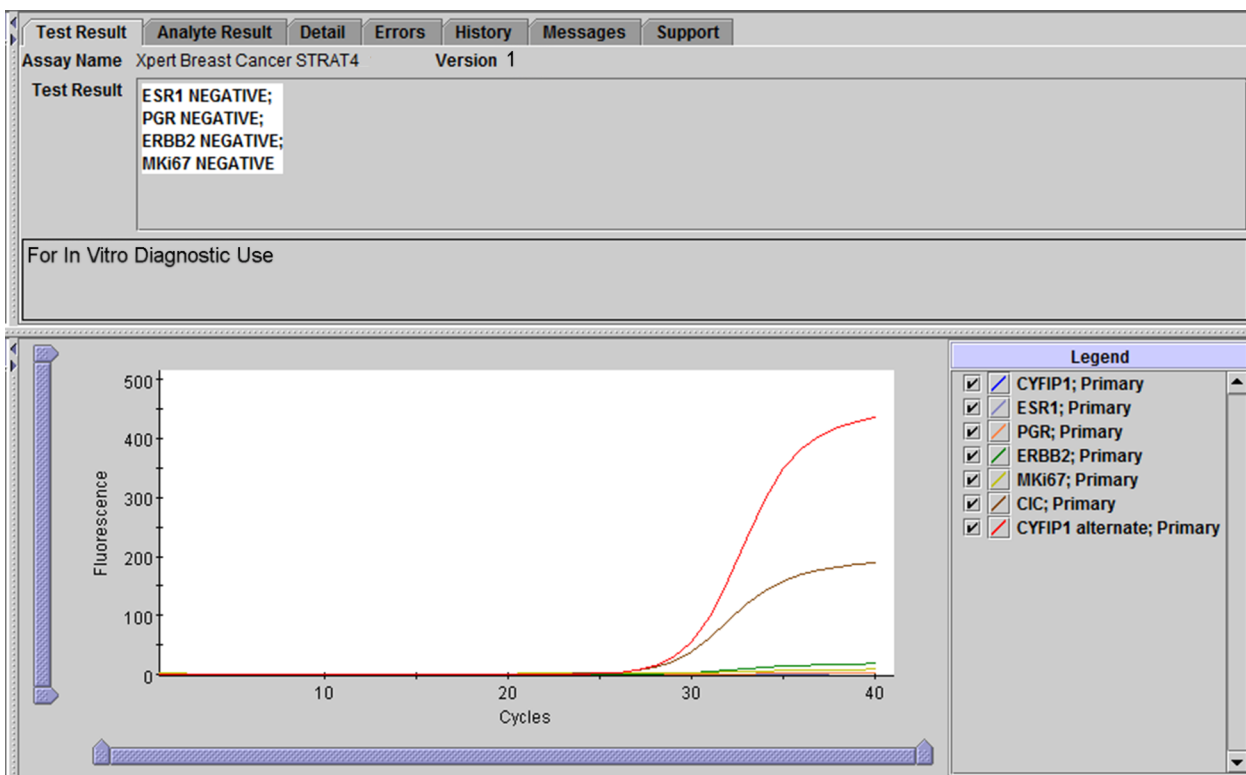
Resultat	Fortolkning
ESR1-POSITIV Se Figur 2.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i>-mRNA-transkript er overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) over skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
PGR-POSITIV Se Figur 2.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-transkript er overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) over skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
ERBB2-POSITIV Se Figur 2.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i>-mRNA-transkript er overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) over skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
MKi67-POSITIV Se Figur 2.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-transkript er overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) over skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
ESR1-NEGATIV Se Figur 3.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i>-mRNA-transkript er ikke overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) under skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
PGR-NEGATIV Se Figur 3.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-transkript er ikke overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) under skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
ERBB2-NEGATIV Se Figur 3.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i>-mRNA-transkript er ikke overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) under skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.

Resultat	Fortolkning
<p>MKi67-NEGATIV</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-transkript er ikke overeksprimeret og har en delta-cyklustærskel (dCt) under skæringsindstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
<p>PGR-ubestemmelig</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-ekspressionsniveau kan ikke bestemmes, da prøven indeholder utilstrækkeligt materiale. Gentag testen med et mere koncentreret lysat. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i>-cyklustærskel (Ct) var ikke inden for det gyldige område, eller slutpunktet var under den nødvendige tærskelindstilling for bestemmelse af PGR-status. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
<p>MKi67-ubestemmelig</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-ekspressionsniveau kan ikke bestemmes, da prøven indeholder utilstrækkeligt materiale. Gentag testen med et mere koncentreret lysat. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i>-cyklustærskel (Ct) var ikke inden for det gyldige område, eller slutpunktet var under den nødvendige tærskelindstilling for bestemmelse af MKi67-status. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
<p>GENTAG TEST (REPEAT TEST)</p> <p>Se Figur 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>-mRNA-ekspressionsniveauer kan ikke bestemmes. Gentag testen med en aliquot af opbevaret FFPE-prøvelysat. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅET (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist og har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – POS/NEG; <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript blev påvist. Det er uvist, om transkriptet har en cyklustærskel (Ct) inden for det gyldige område og slutpunkt over tærskelindstillingen. • CIC – NEG; intern kontrol har en cyklustærskel (Ct) uden for det gyldige område. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.
<p>UGYLDIG (INVALID)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UGYLDIG (INVALID) – <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>-mRNA-ekspressionsniveau kan ikke bestemmes, da prøven indeholder utilstrækkeligt materiale. Gentag testen med et mere koncentreret lysat. • <i>CYFIP1</i> – MISLYKKET (FAIL); <i>CYFIP1</i>-cyklustærskel (Ct) var ikke inden for det gyldige område, eller slutpunktet var under tærskelindstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i>-cyklustærskel (Ct) var ikke inden for det gyldige område, eller slutpunktet var under tærskelindstillingen. • Probekontrol – BESTÅET (PASS); alle probekontrolresultater bestod.

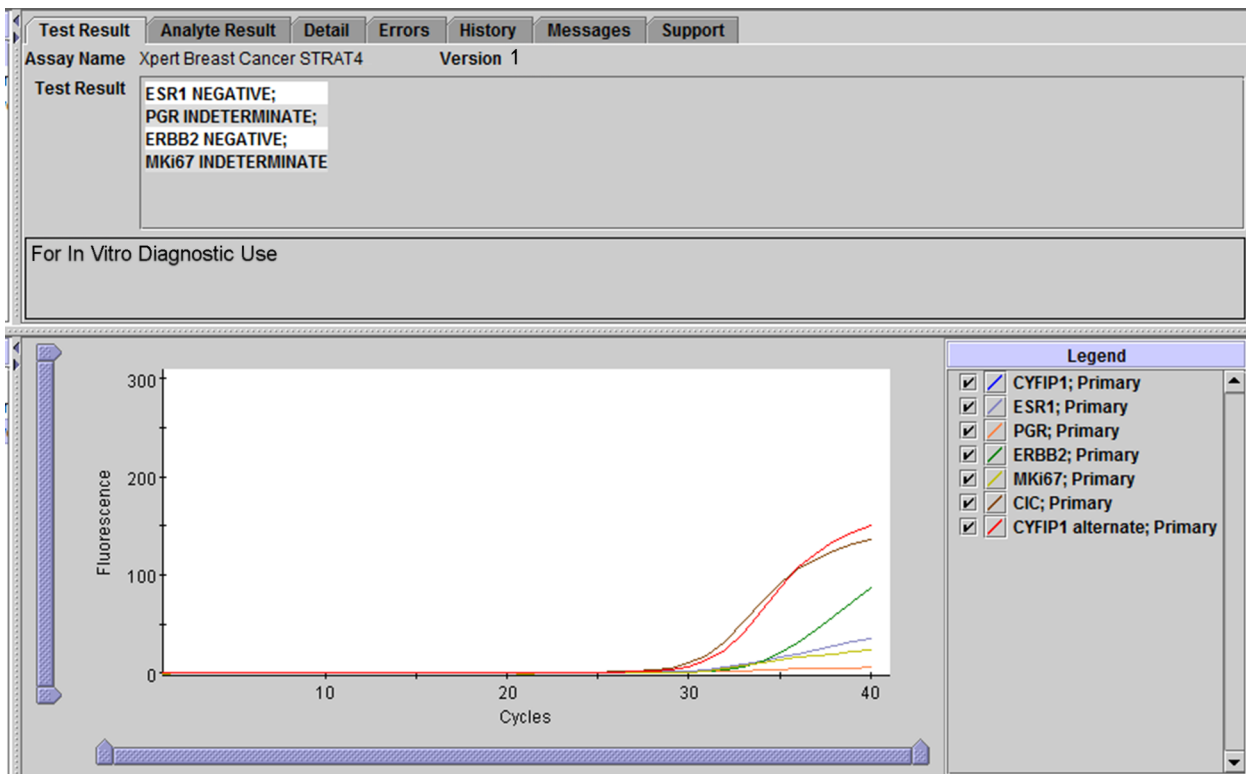
Resultat	Fortolkning
FEJL (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>-mRNA-ekspressionsniveauer kan ikke bestemmes. Gentag testen med en alikvot af opbevaret FFPE-prøvelysat. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INTET RESULTAT (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i>-alternativ – INTET RESULTAT (NO RESULT) • Probekontrol – BESTOD*/MISLYKKET (PASS*/FAIL)*; alle eller et af probekontrolresultaterne er mislykket. <p>*Hvis probekontrollen er bestået, skyldtes fejlen den maksimale trykgrænse, der overskrider det acceptable område, en kurvetilpasningsfejl eller en fejl i en systemkomponent.</p>
INTET RESULTAT (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>-mRNA-ekspressionsniveauer kan ikke bestemmes. Der var indsamlet utilstrækkelige data til at frembringe et testresultat. Dette kan f.eks forekomme, hvis operatøren stoppede en test, der var i gang. Gentag testen med opbevaret FFPE-prøvelysat. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INTET RESULTAT (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i>-alternativ – INTET RESULTAT (NO RESULT) • Probekontrol – Ikke relevant (NA)



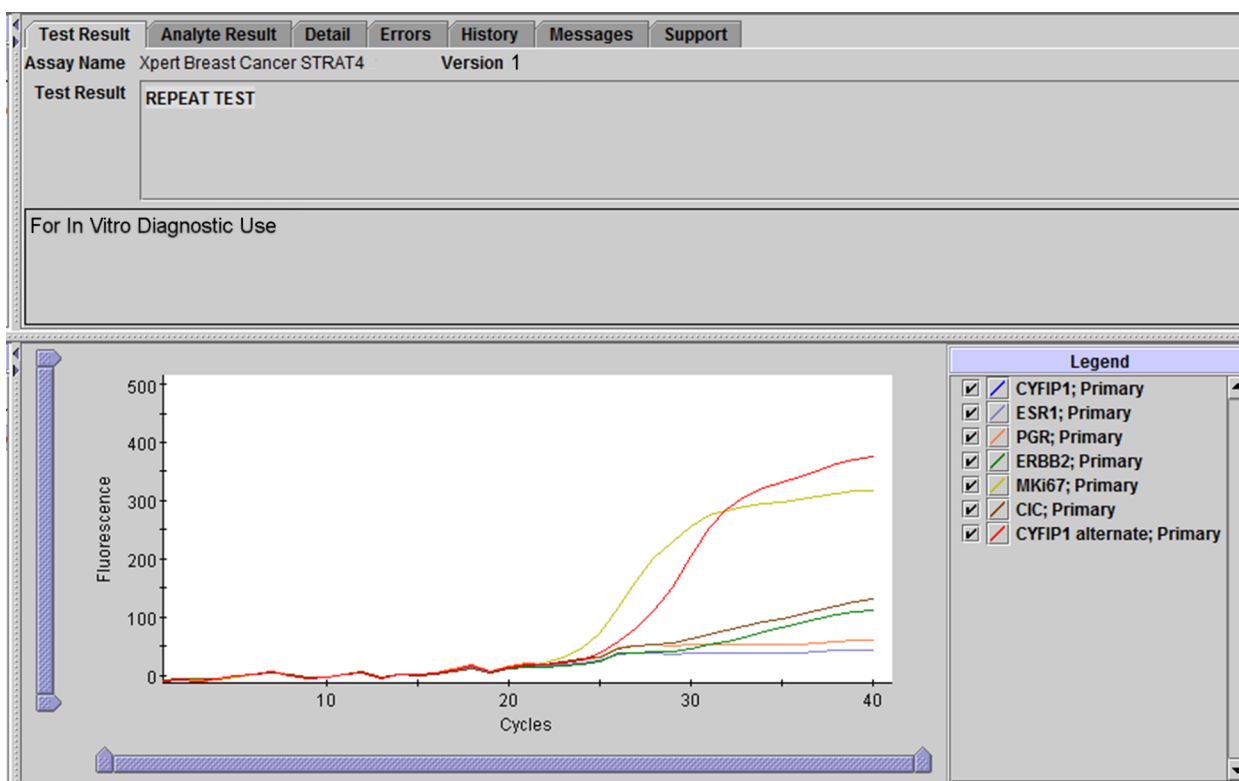
Figur 2. Vinduet Vis resultater (View Results) på GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67-POSITIV (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVE)



Figur 3. Vinduet Vis resultater (View Results) på GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67-NEGATIV (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVE)



Figur 4. Vinduet Vis resultater (View Results) på GeneXpert Dx: PGR/MKi67-UBESTEMMELIG (PGR/MKi67 INDETERMINATE)



Figur 5. Vinduet Vis resultater (View Results) på GeneXpert Dx: GENTAG TEST (REPEAT TEST)

16 Grunde til at gentage testen

Gentag testen med en ny kassette (kassetten må ikke genanvendes).

- Resultatet **GENTAG TEST (REPEAT TEST)** angiver, at den interne kontrol mislykkedes. Prøven blev ikke behandlet korrekt. I dette tilfælde skal testen gentages med en ny 520 µl alikvot af det samme FFPE-lysat.
- Resultatet **UGYLDIG (INVALID)** angiver, at referencekontrollen mislykkedes. Prøven blev ikke behandlet korrekt, PCR blev hæmmet, eller RNA-kvaliteten i den foreliggende tumor var utilstrækkelig. I dette tilfælde skal testen gentages med et mere koncentreret FFPE-lysat i henhold til anvisningerne i brugsanvisningen til FFPE-lysis kittet.
- Resultatet **FEJL (ERROR)** angiver, at probekontrollen mislykkedes, og at analysen blev afbrudt muligvis på grund af, at reaktionsrøret blev fyldt forkert, der blev registreret et integritetsproblem med reagensproben, fordi de maksimale trykgrænser blev overskredet, eller der blev registreret en fejl med ventilpositionering. I dette tilfælde skal testen gentages med en ny 520 µl alikvot af det samme FFPE-lysat.
- Et **INTET RESULTAT (NO RESULT)** angiver, at der ikke blev indsamlet tilstrækkelige data. For eksempel at operatøren stoppede en test, der var i gang, eller der opstod en strømafbrydelse. I dette tilfælde skal testen gentages med en ny 520 µl alikvot af det samme FFPE-lysat.
- Hvis en ekstern kvalitetskontrol ikke fungerer som forventet, skal du gentage den eksterne kontroltest og/eller kontakte Cepheid for at få hjælp.

17 Begrænsninger

- Ændringer af disse procedurer kan ændre testens ydeevne. Resultater fra Xpert Breast Cancer STRAT4 skal fortolkes sammen med andre laboratoriemæssige og kliniske data, som klinikerer har til rådighed.
- Ydeevnen af Xpert Breast Cancer STRAT4 blev valideret ved hjælp af de procedurer, der er angivet i denne brugsanvisning, og ved anvendelse af FFPE-præparater, der var fem til ti år gamle.
- Ydeevnen af Xpert Breast Cancer STRAT4 blev alene valideret ved hjælp af procedurerne i denne brugsanvisning.

- Fejlagtige testresultater kan forekomme på grund af forkert indsamling, håndtering eller opbevaring af præparater eller forveksling af præparater. Det er nødvendigt at overholde anvisningerne i denne brugsanvisning nøje for at undgå fejlagtige resultater.
- Ydeevneegenskaber blev ikke fastlagt for patienter under 25 år.
- Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probebindingsregioner kan føre til fejlagtige, men troværdige resultater for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*.

18 Ydeevneegenskaber

18.1 Klinisk ydeevne

Ydeevneegenskaberne for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen blev evalueret i forhold til IHC resultater for ER, PR, HER2 og Ki67 og til fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) for HER2-genamplifikation på undersøgelsessteder i USA og EU. Indledningsvist indgik i alt 211 afidentificerede tiloversblevne FFPE-præparater af primære invasive brystkræfttumorer fra USA og EU i denne undersøgelse. 10 præparater blev ekskluderet, fordi der var utilstrækkelig tumor tilgængelig til testning, og et præparat blev ekskluderet på grund af tilbagetrukket samtykke. Således var i alt 200 præparater tilgængelige til inddragelse i dataanalyserne. For hvert FFPE-præparat blev der klargjort flere objektglas til testning med Xpert, til IHC-testning af ER, PR, HER2 og Ki67 samt til FISH-testning af HER2-genamplifikation.

Samlet gav Xpert Breast Cancer STRAT4 gyldige resultater for det første testforsøg for 99,5 % (199/200) af præparaterne i undersøgelsen. Ét præparat, som i starten gav et ubestemt resultat (**FEJL (ERROR)**, **UGYLDIG (INVALID)** eller **INTET RESULTAT (NO RESULT)**), gav et testresultat efter en enkel gentest. Den samlede successrate for analysen var 100,0 % (200/200).

Af de 200 præparater med gyldige Xpert-testresultater gav *ESR1* og *ERBB2* et gyldigt positivt eller negativt testresultat 100 % af tiden (200/200). For *PGR* og *MKi67* gav Xpert et gyldigt positivt eller negativt testresultat i henholdsvis 98,5 % (197/200) og 97,0 % (194/200) af tilfældene. De 7 præparater med ikke-bestemmelige Xpert-resultater for *PGR* og/eller *MKi67* blev gentestet ved anvendelse af metoden med koncentreret FFPE-lysat. Både de oprindelige resultater (første forsøg) og resultaterne fra gentesten vises i Tabel 3.

For hele datasættet, inklusive gentestresultaterne, viste Xpert Breast Cancer STRAT4 en positiv overensstemmelse i procent (PPA) på 97,2 %, en negativ overensstemmelse i procent (NPA) på 95,0 %, og en samlet overensstemmelse i procent (OPA) på 97,0 % for *ESR1* i forhold til IHC;¹⁸ PPA på 88,4 %, NPA på 90,7 % og OPA på 88,9 % for *PGR* i forhold til IHC;¹⁸ PPA på 100,0 %, NPA på 92,4 % og OPA på 93,3 % for *ERBB2* i forhold til IHC¹⁹ og PPA på 100 %, NPA på 92,0 % og OPA på 93,3 % for *ERBB2* i forhold til HER2-FISH.¹⁹ For *MKi67* en PPA på 88,8 %, NPA på 100 % og OPA på 90,7 % med IHC-tærsklen sat til > 20 % for positiv og < 10 % for negativ. Intermediært IHC-følsomme *MKi67*-præparater (10 %-20 % tærskel, begge inklusive) blev ekskluderet fra analysen. Den samlede PPA, NPA og OPA for hvert mål vises i Tabel 3.

Tabel 3. Klinisk ydeevne

Sammenligning	Datasæt ^a	I alt (n) ^b	PPA	95% CI	NPA	95% CI	OPA	95% CI
ESR1/ER Xpert vs. 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
	Gentest	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	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
	Gentest	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	Original	180	100 % (22/22)	85,1-100	92,4 % (146/158)	87,2-95,6	93,3 % (168/180)	88,7-96,1
	Gentest	180	100 % (22/22)	85,1-100	92,4 % (146/158)	87,2-95,6	93,3 % (168/180)	88,7-96,1
ERBB2/HER2 Xpert vs. FISH	Original	178	100 % (28/28)	87,9-100	92,0 % (138/150)	86,5-95,4	93,3 % (166/178)	88,6-96,1
	Gentest	178	100 % (28/28)	87,9-100	92,0 % (138/150)	86,5-95,4	93,3 % (166/178)	88,6-96,1

Sammenligning	Datasæt ^a	I alt (n) ^b	PPA	95% CI	NPA	95% CI	OPA	95% CI
ERBB2/HER2 Xpert vs. 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
	Gentest	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	Original	148	88,7 % (110/124)	81,9-93,2	100 % (24/24)	86,2-100	90,5 % (134/148)	84,7-94,3
	Gentest	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 i henhold til anvisninger i brugsanvisningen; Gentest = resultat af gentest på et 4X koncentreret lysat i tilfælde, hvor det originale præparat (1X lysat) gav et ikke-bestemmeligt resultat for PGR og/eller MKi67.

^b Præparater med ikke-bestemmelige eller ubestemmelige Xpert-resultater, præparater med tvetydige eller intermedieære IHC-resultater, præparater med mislykket IHC og mislykket FISH er ekskluderet.

19 Analytisk ydeevne

19.1 Analytisk sensitivitet/minimum analyseinput

Minimum analyseinput blev bestemt ved at vurdere den maksimale CYFIP1 Ct (referencegen), der bestemmer det påkrævede prøveinput korrekt for fyldestgørende analyseydeevne. Dette prøveinput sikrer, at der opnås gyldige resultater i de fleste testede kliniske FFPE-prøver. Prøver med en CYFIP1 Ct-værdi, der er højere end den tilladte, vil generere et **UGYLDIGT** resultat.

Analytisk sensitivitet/minimum analyseinput for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen, defineret som den maksimale CYFIP1 Ct, der resulterer i $\geq 95\%$, blev fastlagt ved hjælp af fortyndinger af kliniske FFPE-prøvelysater med henblik på CYFIP1 Ct-challenge. For at vurdere sensitiviteten af CYFIP1 Ct blev et klinisk FFPE-prøvelysat fortyndet serielt og testet med N=20 replikater pr. fortyndingsniveau over 3 dage, indtil $\leq 95\%$ af testresultaterne var gyldige. Fortyndingsniveauerne omfattede et præparat ved det forventede minimum analyseinput, to niveauer under og to niveauer over dette. Testning udførtes på to partier Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter.

Inden undersøgelsens indledning udførtes testning af blankprøvegrænse med N=60 replikater med anvendelse af to uafhængige partier af Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter. Blankprøvegrænsen bestod af et blankt paraffinsnit (ikke en vævsprøve), og alle testresultater viste de forventede resultatbestemmelser UGYLDIG (**UGYLDIGT**). Serielle fortyndinger af det kliniske FFPE-vævsprøveinput ved 1/1000 gav 20/20 gyldige CYFIP1 Ct-værdier med middel Ct = 33,4 og 0,6 SD fra parti 1 af Xpert Breast Cancer STRAT4-testen og middel Ct = 33,6 og 0,5 SD fra parti 2. Yderligere fortyndinger med senere CYFIP1 Ct-værdier opfyldte ikke de påkrævede $\geq 95\%$ gyldige resultater til undersøgelsen. Tabel 4 opsummerer antallet af gyldige testkørsler ved hvert serielt fortyndt prøveinputniveau som relativ fortynding eller som middel CYFIP1 Ct. Den analytiske sensitivitet ved anvendelse af to partier Xpert Breast Cancer STRAT4-testkassetter viste et krav om minimum analyseinput for CYFIP1 Ct = 33,4. Kombineret med analysevariabilitet ville denne værdi gøre det acceptabelt at sætte den øvre grænse for CYFIP1 Ct = 35 for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.

Tabel 4. Minimum analyseinput i Xpert Breast Cancer STRAT4

Kitparti	Prøveinput (relativ fortynding)	Middel CYFIP1 Ct	SD	N gyldig kørsel (Ct \leq 35)
00801 (parti 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
	Ingen skabelonkontrol	Ikke relevant	Ikke relevant	0/20
00903 (parti 2)	1/20	27,8	0,3	20/20

Kitparti	Prøveinput (relativ fortynding)	Middel CYFIP1 Ct	SD	N gyldig kørsel (Ct ≤ 35)
	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
	Ingen skabelonkontrol	Ikke relevant	Ikke relevant	0/20

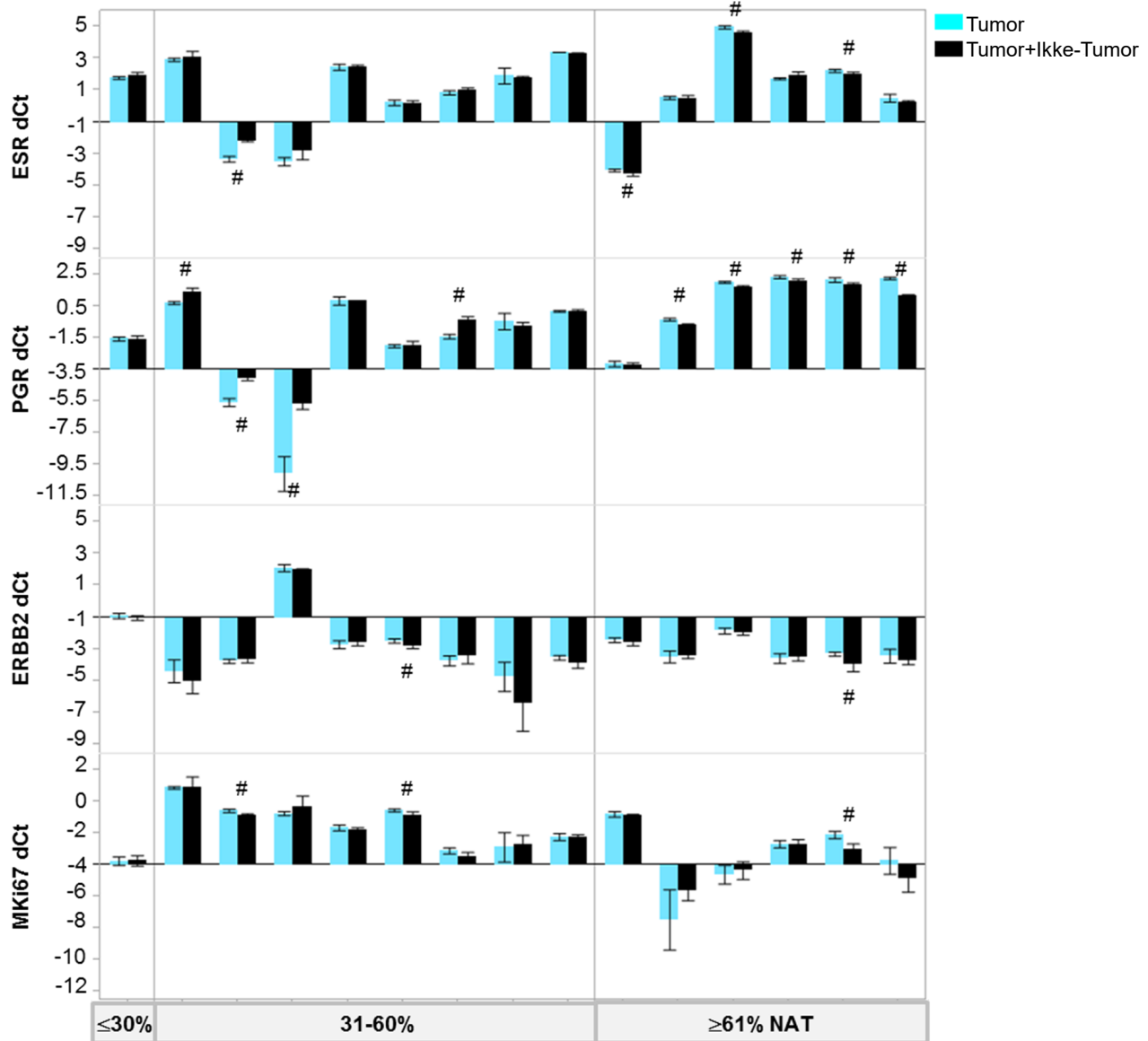
19.2 Interferenstestning

Tilstødende normalt/ikke-tumor væv

Normale tilstødende (ikke-tumor) væv (NAT) er hyppigt til stede i præparater af brystkræftvæv som kontaminanter, der potentielt kan interferere med påvisning af specifikke mål. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen kan kræve, at et patologisk bekræftet FFPE-snit af brystkræft makrodissekeres for at minimere potentielle virkninger af ikke-tumor kontaminanter i tilfælde, hvor en patolog finder det relevant. For at vurdere virkningen af tilstødende normale/ikke-tumor væv blev femten (15) FFPE-vævsblokke med invasivt brystkarcinom indeholdende 21-98 % omgivende NAT testet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen med og uden makrodissektion. Xpert Breast Cancer STRAT4-testning udførtes med N=4 replikater fra samme lysat pr. tilstand. ESR1-, PGR-, ERBB2- og MKi67-dCt'er for hver vævsprøve med makrodissektion (søjlediagram i blå) eller uden makrodissektion (søjlediagram i sort) blev først evalueret ved hjælp af ensidet ANOVA for at bestemme statistisk interferens fra NAT. Klinisk signifikant interferens fra NAT ansås for at være tilstede, når ddCt (delta-delta Ct) mellem makrodissekerede og ikke-makrodissekerede prøver var > 1,0, og der var en ændring i testresultatet. Undersøgelsesresultaterne er sammenfattet i Figur 6.

ESR1-, PGR-, ERBB2- og MKi67-dCt'er for alle 15 prøver blev grupperet baseret på % NAT (≤ 30 %, 31-60 % eller ≥ 61 %). Blå og sorte lodrette søjlediagrammer med SD repræsenterer middel mål-dCt'er fra N=4 replikater af makrodissekerede og ikke-makrodissekerede FFPE-snit af en FFPE-blok af invasiv brystkræft. Alle 15 FFPE-blokke (N=1 under 30 % NAT, N=8 med 31-60 % NAT og N=6 over 60 % NAT) viste enten ingen statistisk signifikans med hensyn til interferens fra normalt/ikke-tumor væv baseret på ensidede ANOVA-analyser med p-værdi $\geq 0,05$, eller viste ingen klinisk signifikans (angivet med #), hvis variationen i delta-Ct-værdier for hvert mål mellem makrodissekerede eller ikke-makrodissekerede prøver var $\leq 1,0$ eller når testresultaterne for målene (positiv, negativ) forblev upåvirket.

Figur 6. Interferens fra tilstødende normalt/ikke-tumor væv med Xpert Breast Cancer STRAT4-mål-dCt'er



DCIS, nekrotisk, blodfyldt væv

For at vurdere virkningen af ductalt karcinom in situ (DCIS), nekrotiske og blodfyldte væv, blev i alt 9 FFPE-brysttumorprøver (3 FFPE-brysttumorblokke indeholdende 3-61 % DCIS, 3 FFPE-blokke indeholdende 10-65 % nekrotisk væv og 3 FFPE-blokke indeholdende 15-41 % blodfyldt væv) testet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen med og uden makrodissektion. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen blev udført med N=4 replikater fra samme lysat pr. tilstand. Alle testtilstandene fandtes enten ikke at have nogen statistisk eller klinisk signifikant påvirkning af varierende kontamination fra DCIS, nekrotisk og blodfyldt væv ved anvendelse af Xpert Breast Cancer STRAT4-testen (grafisk præsentation af data ikke vist).

Humant genomisk DNA (hgDNA)

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen benytter højspecifikke primere og prober til effektivt at hybridisere med ESR1-, PGR-, ERBB2- og MKi67-mRNA-målskabeloner fra en pulje af genomiske nukleinsyrer (humant genomisk DNA = hgDNA). For at vurdere virkningen af hgDNA på Xpert Breast Cancer STRAT4-testen blev 10 FFPE-brysttumorblokke med varierende celleindhold fra invasivt ductalt karcinom makrodissekeret og testet med og uden tilsætning af 25 ng hgDNA til FFPE-prøvelysater ved anvendelse af Xpert Breast Cancer STRAT4-testen i N=4 replikater fra samme lysat pr. tilstand. Alle testtilstandene fandtes enten ikke at have nogen statistisk eller klinisk signifikant påvirkning af hgDNA-interferens (grafisk repræsentation af data ikke vist).

19.3 Overføringskontaminering

Der blev gennemført en undersøgelse for at vise, at selvstændige GeneXpert-kassetter til engangsbrug minimerer overføringskontaminering fra meget høje positive prøver til efterfølgende negative prøver, der køres i det samme GeneXpert-modul. Undersøgelsen bestod af en negativ prøve, der blev behandlet i det samme GeneXpert-modul umiddelbart efter en højpositiv ESR1/PGR/ERBB2/MKi67-prøve. Den negative prøve bestod af *in vitro*-transkriberet (IVT-) RNA, der indeholdt CYFIP1-transkript ved 5×10^4 kopier for at sikre tilstedeværelse af et referencegenmål. Den højpositive prøve bestod af IVT-RNA, der indeholdt CYFIP1-transkript ved 5×10^5 kopier, og IVT-RNA indeholdende ESR1, PGR, ERBB2 og MKi67-transkripter ved 5×10^6 kopier, klargjort som FFPE-lysat. Testplanen blev gentaget 41 gange med et enkelt GeneXpert-modul for i alt 20 højpositive og 21 negative prøver. Alle 20 højpositive prøver blev korrekt rapporteret som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67-POSITIVE (POSITIVE), og alle 21 negative prøver blev korrekt rapporteret som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67-NEGATIVE (NEGATIVE).

19.4 Analysens reproducerbarhed og præcision

Reproducerbarhed for Xpert Breast Cancer STRAT4 blev evalueret ved anvendelse af et panel af fem prøver af lysatpræparater.

Tre panelmedlemmer blev klargjort ved at tilsætte *in vitro*-transkriberet (IVT-) RNA til FFPE-lysisbuffer, som blev tilsat inden for ~2dCts for dCt-skæringsværdierne for ESR1 (1 IVT RNA), PGR (2 IVT RNA) og ERBB2 (3 IVT RNA), og som havde CYFIP1 Ct-værdier ~2-3 Cts fra minimum analyseinputniveauet.

To panelmedlemmer (4 kliniske FFPE-prøver og 5 kliniske FFPE-prøver) blev dannet fra puljede kliniske FFPE-prøver i FFPE-lysisbuffer for at generere CYFIP1 Ct-værdier tæt på minimum analyseinputtet og for at have dCt-skæringsværdier for alle mål hen over det rapporterbare område, og i det omfang det er muligt, tæt på analysens dCt-skæringsværdier.

To operatører på hvert af de tre undersøgelsessteder testede to paneler med fem prøver pr. dag over seks testdage (fem prøver x seks dage x to operatører x to replikater x tre steder). I alt blev der testet 72 replikater pr. prøve. Tre partier Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter blev anvendt på de tre undersøgelsessteder. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen blev udført i overensstemmelse med proceduren i denne brugsanvisning.

Reproducerbarheden af Xpert Breast Cancer STRAT4 blev evalueret med hensyn til dCt for hvert af de fire mål for hvert panel. Gennemsnittet, standardafvigelsen (SD) og variationskoefficienten (CV) mellem steder, mellem partier, mellem dage, mellem operatører og inden for analyse for hvert panelmedlem er vist i Tabel 5.

Tabel 5. Resumé af reproducérbarhedsdata

Prøve	Analysekanal (analyt)	N ^a	Middel dCt	Mellem sted		Mellem parti		Mellem dag		Mellem operatør		Inden for analysen		Samlet	
				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
4-FFPE klinisk prøve	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

Prøve	Analysekanal (analyt)	N ^a	Middel dCt	Mellem sted		Mellem parti		Mellem dag		Mellem operatør		Inden for analysen		Samlet	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
	MKi67	72	-0,93	0,00	0,00	0,02	36,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	63,50	0,04	0,21
5- FFPE klinisk prøve	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 Resultater med gyldige delta-Ct-værdier ud af 72

20 Referencer

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, Karaolani G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84:219-225.
10. Fasching PA, Heusinger K, Haerberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C, Schulz-Wendtland R, Bani MR, Schrauder M, Kahmann L, Lux MP, Strehl JD, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Wachter DL. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 Nov 14; 11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
11. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008 Aug;17(4):323-3.4.
12. de Matos LL, Truffelli DC, Luongo de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights* 2010;5, 9-20
13. Roepman P, Horlings HM, Krijgsman O, Kok M, Bueno-de-Mesquita JM, Bender R, Linn SC, Glas AM, van de Vijver MJ. Microarray-Based Determination of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Status in Breast Cancer *Clin Cancer Res* 2009; 15(22) 7003-11.
14. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Bayde S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Magnu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134:907-922.
15. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013; 31(31): 3997-4013.

16. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 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 Cepheid hovedsædelokaliteter

Virksomhedshovedsæde

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Hovedsæde i EU

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Teknisk assistance

Før du kontakter Cepheids tekniske support, skal du indsamle følgende oplysninger:

- Produktnavn
- Partinummer
- Instrumentets serienummer
- Fejlmeddelelser (hvis nogen)
- Softwareversion og, hvis det er relevant, mærkenummer til computerservice

USA




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









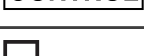



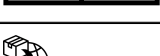

Frankrig

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

Kontaktoplysninger for alle Cepheids tekniske supportkontorer fås på vores hjemmeside: www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Symboltabel

Symbol	Betydning
	Katalognummer
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	CE-mærkning – EU-overensstemmelse

Symbol	Betydning
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab
	Må ikke genbruges
	Batchkode
	Se brugsanvisningen
	Forsigtig
	Fabrikant
	Fremstillingsland
	Indeholder tilstrækkeligt til n tests
	Kontrol
	Udløbsdato
	Temperaturbegrænsning
	Biologiske risici
	Autoriseret repræsentant i Schweiz
	Importør



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 Revisionshistorik

Afsnit	Beskrivelse af ændring
Symboltabel	Tilføjede symboler for CH REP og importør samt definitioner i symboltabellen. Tilføjede oplysninger om adresse i Schweiz til CH REP og importør.
Revisionshistorik	Opdaterede tabellen med Revisionshistorik.