

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Istruzioni per l'uso

IVD CE

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

Cepheid[®], il logo Cepheid, GeneXpert[®] e Xpert[®] sono marchi di Cepheid, registrati negli USA e in altri Paesi.

Tutti gli altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRASFERIBILE DI UTILIZZARLO IN ACCORDO ALLE PRESENTI ISTRUZIONI PER L'USO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

© 2017-2023 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere la Cronologia delle revisioni.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Dispositivo medico diagnostico *in vitro*

1 Nome registrato

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Nome comune o usuale

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Uso previsto

Xpert Breast Cancer STRAT4 è un saggio semiquantitativo basato sulla reazione a catena della polimerasi, con valori di cutoff qualitativi per l'mRNA del recettore degli estrogeni (*ESR1*), del recettore del progesterone (*PGR*), del recettore del fattore di crescita umano dell'epidermide 2 (*ERBB2/HER2*) e del marcatore di proliferazione Ki-67 (*MKI67*), isolato da tessuto con cancro della mammella invasivo fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). L'RNA è estratto da un'area di una sezione tissutale per microscopia arricchita di cellule tumorali e identificata da un patologo. Il test va usato in abbinamento ad altri dati clinici e di laboratorio per classificare i tessuti del cancro della mammella per quanto riguarda lo stato dei recettori ormonali, lo stato del recettore HER2 e lo stato dei marcatori di proliferazione. Il test è destinato all'uso con il sistema GeneXpert[®], che include l'isolamento dell'RNA dal tessuto FFPE, nonché l'amplificazione e il rilevamento delle sequenze bersaglio all'interno della cartuccia.

Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 non è previsto come:

- predittore della gravità della malattia;
- dispositivo autonomo per analisi diagnostiche del cancro della mammella;
- prognosticatore della recidiva della malattia.

Indicazioni per l'uso – Il test è previsto per l'uso nella determinazione dei livelli di mRNA di *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKI67* nei tessuti con cancro della mammella invasivo ottenuti da pazienti e preparati come campioni FFPE, e come ausilio nella valutazione clinica assieme ad altri dati di laboratorio.

4 Riepilogo e spiegazione

Il carcinoma della mammella è una delle forme di carcinoma più comuni tra le donne in tutto il mondo, con circa 1,7 milioni di nuovi casi ogni anno.¹ In Europa vengono diagnosticati circa 494.000 casi ogni anno e circa 143.000 pazienti muoiono di questa malattia. Negli USA, circa 200.000 nuovi casi di carcinoma della mammella invasivo sono stati diagnosticati nel 2015.² Il carcinoma della mammella è la causa più comune di mortalità da cancro tra le donne nei Paesi in via di sviluppo e la seconda più comune tra le donne delle nazioni sviluppate (dopo il cancro al polmone).²

Nelle donne il carcinoma della mammella è il cancro più diagnosticato e la causa principale di morte per cancro.¹ Dal 1990 la mortalità per il carcinoma della mammella è scesa del 34% in gran parte grazie a migliori trattamenti e a una diagnosi precoce.³ Le misure dell'espressione delle proteine ER e PR sono fattori prognostici degli esiti del carcinoma della mammella e predicono la risposta al tamoxifene e ad altre terapie ormonali.^{4,5,6,7} L'iperespressione di HER2 rappresenta una prognosi avversa nelle donne con carcinoma della mammella; ma, cosa più importante, l'iperespressione della proteina HER2 (*ERBB2*) o l'amplificazione del gene HER2 predicono la risposta al trastuzumab o ad altre terapie mirate a HER2.⁸ Il marcatore di proliferazione Ki-67 (*MKI67*) è stato ampiamente studiato in studi retrospettivi svolti su pazienti con carcinoma della mammella⁹ ed è considerato un importante indicatore della necessità di chemioterapia.¹⁰ Metanalisi

hanno dimostrato che è associato a peggiori esiti di sopravvivenza nel carcinoma della mammella in fase iniziale.¹¹ Data l'importanza di questi marcatori nella scelta di un regime terapeutico efficace per le pazienti con carcinoma della mammella, le linee guida di trattamento dell'European Society for Medical Oncology (ESMO) consigliano di analizzare tutti i carcinomi della mammella primitivi, non appena vengono diagnosticati, per ER, PR, HER2 (ERBB2) e Ki67.¹²

Per misurare l'espressione proteica dei geni ER, PR, HER2 e Ki67 viene comunemente impiegata la tecnica immunohistochimica (IHC). Per l'espressione di HER2, l'IHC è normalmente il primo test eseguito e i risultati sono refertati su una scala da 0 a 3+. Se il risultato per l'espressione di HER2 è dubbio (2+), il campione viene sottoposto a un saggio di ibridazione in situ (ISH) per HER2, quale l'ibridazione in situ tramite fluorescenza (FISH) o l'ibridazione in situ cromogenica (CISH) che rileva l'amplificazione del gene HER2.¹³ È stato osservato un alto grado di variabilità nei risultati per IHC e ISH confrontati tra laboratori diversi, ampiamente dovuta alle differenze negli anticorpi utilizzati per l'IHC e alla soggettività dei metodi di interpretazione.¹⁴

Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 è un test diagnostico in vitro usato per determinare i livelli di espressione dell'mRNA dei geni *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67* isolato da campioni FFPE di tessuto con carcinoma della mammella invasivo.

Il saggio viene eseguito in cartuccia chiusa in seguito a una breve fase, esterna alla cartuccia, di preparazione del lisato dal campione; richiede meno di 15 minuti di tempo operatore, con un tempo di acquisizione dei risultati complessivo inferiore alle 2 ore.

5 Principio della procedura

Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 utilizza la reazione a catena della polimerasi real time (PCR) per il rilevamento dell'mRNA di *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67* isolato da tessuto di carcinoma mammario invasivo fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Il saggio viene eseguito sui sistemi di strumentazione GeneXpert Cepheid, i quali consentono di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi utilizzando la RT-PCR real time. I sistemi comprendono uno strumento, un lettore di codici a barre, un computer e un software già installato per l'esecuzione dei test e la visualizzazione dei risultati. I sistemi utilizzano cartucce GeneXpert monouso che contengono i reagenti per la RT-PCR in cui si svolge il processo reattivo. Per una descrizione completa dei sistemi, fare riferimento al Manuale dell'operatore del sistema di strumentazione GeneXpert appropriato.

Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 include i reagenti per il rilevamento simultaneo dei geni *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, un gene di riferimento della proteina citoplasmica 1 che interagisce con *FMR1* (*CYFIP1*), un controllo RT-PCR interno (*CIC*) e un controllo per la verifica della sonda (*PCC*) interno. Il gene di riferimento verifica l'adeguatezza del campione di analisi e serve per normalizzare i livelli di espressione mRNA per *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67*. Il controllo RT-PCR interno (*CIC*) viene usato per verificare che la reazione RT-PCR sia avvenuta correttamente. Il *PCC* verifica la reidratazione delle microsfere dei reagenti, il riempimento delle provette della RT-PCR, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti nella cartuccia. In totale, il saggio utilizza sei distinti canali di fluorescenza per il rilevamento del bersaglio o del controllo/riferimento con propri parametri di cutoff per la validità del bersaglio/controllo/riferimento.

I campioni FFPE devono essere prima trattati con l'Xpert® FFPE Lysis Kit preparando una sezione di tessuto di 4-5 µm (micron) di spessore; il tessuto FFPE viene prima sottoposto a macrodissezione, se necessario, per arricchiare l'area con tumore invasivo, poi raschiato e posto in una provetta assieme ai volumi consigliati di reagente di lisi FFPE e proteinasi K. La soluzione viene quindi incubata in un termoblocco a 80 °C per 30 minuti. Successivamente, il campione viene miscelato con etanolo e il volume consigliato di lisato del campione preparato viene aggiunto direttamente a una cartuccia di analisi. La cartuccia di analisi viene inserita in un modulo di un sistema di strumentazione GeneXpert in cui la purificazione, l'amplificazione e il rilevamento real time degli acidi nucleici sono pienamente automatizzati e completamente integrati dal sistema. Tutti i reagenti necessari per la preparazione a bordo del campione e per l'analisi mediante RT-PCR nella cartuccia sono precaricati all'interno della medesima. Gli acidi nucleici nel lisato vengono catturati su un filtro, lavati ed eluiti per sonicazione. L'acido nucleico purificato è miscelato con reagenti per RT-PCR liofilizzati e la soluzione ottenuta viene trasferita in una provetta di reazione per la RT-PCR e il rilevamento. Con il sistema GeneXpert, il risultato si ottiene dopo circa 75 minuti.

I cutoff di rilevamento utilizzati dal test Xpert Breast Cancer STRAT4 in ciascun canale di fluorescenza sono stati stabiliti per massimizzare le percentuali di concordanza positiva, negativa e complessiva in rapporto ai risultati IHC o IHC/FISH del laboratorio di riferimento per ciascun bersaglio. L'IHC per ER, PR, Ki67 e HER2, come la FISH per HER2, sono stati elaborati e valutati in base alle istruzioni per l'uso. L'interpretazione dei risultati è stata completata in osservanza delle linee guida ASCO/CAP 2013.¹⁵ I tumori sono stati classificati come ER o PR IHC positivi quando ≥1% delle cellule tumorali invasive ha dimostrato inequivocabile colorazione nucleare, indipendentemente dall'intensità della colorazione. L'espressione di HER2 è stata valutata con il kit HercepTest (IHC) (Dako) e gli score attribuiti sono stati 0, 1+, 2+ o 3+. I tumori con score 2+ sono stati sottoposti a ulteriore valutazione con FISH per l'HER2 usando il kit di sonde di DNA PathVysion HER2 (Vysis-Abbott, Chicago, IL). I casi sono stati considerati HER2 positivi in presenza di uno score IHC 3+ e/o di amplificazione FISH (definita come rapporto HER2:CEP17 ≥2,0) e/o di un numero medio di copie HER2 ≥6,0

segnali/cellula secondo l'edizione 2013 delle linee guida ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update for HER2 Testing in Breast Cancer.¹⁵ Per quanto riguarda Ki67, i tumori sono stati classificati come positivi (con valori elevati) quando $\geq 20\%$ delle cellule del tumore invasivo ha dimostrato inequivocabile colorazione nucleare, indipendentemente dall'intensità della colorazione.

Nel caso del controllo del gene di riferimento e del controllo RT-PCR interno, i cutoff di rilevamento definiscono i range dei valori di ciclo soglia (Ct) minimi e massimi della PCR che determinano un risultato valido, la quantità input minima adeguata di campione e l'assenza di inibizione della PCR. Nel caso dei bersagli ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67, i cutoff di rilevamento sono definiti dai valori delta di ciclo soglia (dCt) (Ct del gene di riferimento meno Ct del gene target) che determinano i risultati POSITIVO (POSITIVE) rispetto a quelli NEGATIVO (NEGATIVE) per un dato bersaglio in un canale.

6 Reagenti e strumenti

6.1 Materiale fornito

Il kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contiene reagenti sufficienti per trattare 10 campioni di controllo qualità o lisati FFPE preparati con l'Xpert FFPE Lysis Kit (n. catalogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). Il kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contiene quanto segue.

Cartucce del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 con provette di reazione integrate	10
<ul style="list-style-type: none"> • Microsfera 1, 2 e 3 (liofilizzate) • Reagente di risciacquo • Reagente di eluizione 	<ul style="list-style-type: none"> 1 per cartuccia 1,0 ml per cartuccia 2,0 ml per cartuccia
CD	1 per kit
<ul style="list-style-type: none"> • File di definizione del saggio (ADF) • Istruzioni per l'uso • File di rapporto ONCore 	

Nota Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nei siti www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com nella scheda **SUPPORTO (SUPPORT)**.

Nota L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsfere di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

7 Conservazione e manipolazione

- Conservare il contenuto del kit Xpert Breast Cancer STRAT4 a temperature comprese fra 2 °C e 28 °C.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.
- Usare la cartuccia entro 30 minuti dall'apertura del coperchio.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.

8 Materiali necessari ma non forniti

- Xpert FFPE Lysis Kit (n. catalogo GXFFPE-LYSIS-CE-10) per preparare il lisato FFPE. Questo kit contiene reagente di lisi FFPE, proteinasi K (PK), provette da 1,5 ml e flaconcini da 5 ml.
- Miscelatore vortex.

- Pipette e puntali con filtro resistente agli aerosol per pipette da 600 µl, 1,2 µl e 520 µl.
- Computer con software proprietario GeneXpert versione 4.7b o successiva o Xpertise versione 6.4b o successiva, lettore di codici a barre e manuale dell'operatore del sistema di strumentazione GeneXpert appropriato.
- Stampante: se fosse necessario l'uso di una stampante, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata.

9 Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Tutti i campioni biologici devono essere trattati come potenziali veicoli di trasmissione di agenti infettivi. Tutti i campioni umani devono essere trattati in base alle precauzioni standard. Le linee guida per la manipolazione dei campioni di analisi sono disponibili presso l'Organizzazione mondiale della sanità o i centri statunitensi per il controllo e la prevenzione delle malattie (U.S. Centers for Disease Control and Prevention).
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite solo con il tipo di campione di analisi specificato in Sezione 3. Le prestazioni di questo saggio con altri tipi di campioni di analisi non sono state valutate.
- Il tessuto FFPE deve essere trattato con l'Xpert FFPE Lysis Kit (n. catalogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- L'asportazione incompleta (raschiamento) dell'area tumorale dal vetrino per la preparazione del lisato FFPE può rendere insufficiente il materiale per il saggio, determinando quindi un tasso di indeterminati/non validi superiore al previsto con il test Xpert Breast Cancer STRAT4.
- Aprire il coperchio della cartuccia Xpert Breast Cancer STRAT4 solo per aggiungere il lisato FFPE preparato.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.
- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Ogni cartuccia monouso Xpert Breast Cancer STRAT4 deve essere adoperata per l'esecuzione di un solo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Non usare la cartuccia se appare umida o se sembra che il sigillo del coperchio sia stato rotto.
- Non applicare l'etichetta con l'ID campione sul coperchio della cartuccia o sull'etichetta del codice a barre.
- Si consiglia di adottare le buone pratiche di laboratorio che includono il cambio dei guanti tra la manipolazione di un campione di analisi e quello successivo al fine di evitare la contaminazione dei campioni o dei reagenti.
- Rivolgersi al personale addetto allo smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per ottenere informazioni utili sul corretto smaltimento delle cartucce esauste e dei reagenti inutilizzati. Controllare le normative regionali e locali in quanto possono differire dalle normative nazionali sullo smaltimento. Questo materiale può presentare le caratteristiche dei rifiuti pericolosi e richiedere specifici requisiti di smaltimento. Gli istituti sono tenuti a verificare le normative sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi in vigore.

10 Pericoli chimici^{16,17}

Ai sensi del GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche), il presente materiale non è considerato pericoloso.

11 Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

- Usare solo con campioni di analisi FFPE trattati con l'Xpert FFPE Lysis Kit (n. catalogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). Per preparare il tessuto FFPE, seguire le linee guida ASCO/CAP.¹⁵
- Prima dell'analisi con il test Xpert Breast Cancer STRAT4, preparare il lisato FFPE da un blocchetto di tumore FFPE con la più ampia area di carcinoma mammario utilizzabile (minimo 30% di cellularità tumorale) ed effettuare la macrodissezione manuale, se necessaria. Per i campioni di tumore inferiori a 10 mm² con meno del 30% di cellule

tumorali, al fine di ottenere risultati validi può essere necessario seguire la procedura per ottenere un lisato concentrato o usare più di una sezione da 4-5 µm.

- Il lisato FFPE deve essere trasportato al laboratorio a temperature comprese fra 2 °C e 8 °C.
- Il lisato FFPE è stabile per un massimo di 1 settimana a temperature comprese fra 2 °C e 8 °C oppure per 4 settimane a ≤-20 °C prima dell'analisi con il saggio Xpert Breast Cancer STRAT4. Per la conservazione a lungo termine, congelare a -80 °C. È consigliato limitarsi a 1 ciclo di congelamento/scongelo. Scongelo a temperatura ambiente e miscelare il lisato FFPE in vortex per 15 secondi prima dell'uso.

12 Procedura

Importante L'uso della cartuccia Xpert Breast Cancer STRAT4 richiede la preparazione di un lisato mediante l'Xpert FFPE Lysis Kit (n. catalogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Importante Iniziare a usare il saggio entro 30 minuti dall'introduzione del campione preparato nella cartuccia.

12.1 Preparazione del lisato FFPE

Preparare il lisato FFPE in base alle istruzioni per l'uso dell'FFPE Lysis Kit.

12.2 Preparazione della cartuccia

1. Rimuovere la cartuccia dalla confezione di cartone.
2. Miscelare in vortex il lisato FFPE preparato per 15 secondi prima dell'uso.
3. Aprire il coperchio della cartuccia.
4. Con una pipetta, trasferire 520 µl di lisato FFPE nella camera della cartuccia riservata al campione. (Nota: potrebbe essere presente una piccola quantità di precipitato, che però non influisce sulle prestazioni del saggio.)

Conservare il lisato FFPE rimasto a 2 °C-8 °C o a ≤-20 °C per poterlo usare per un'eventuale ripetizione dell'analisi.



Figura 1. Cartuccia Xpert Breast Cancer STRAT4 (vista dall'alto)

5. Chiudere il coperchio della cartuccia. Accertarsi che il coperchio sia bloccato in posizione.

12.3 Avvio del test

Importante Prima di iniziare il test, accertarsi che il file di definizione del saggio (ADF) di Xpert Breast Cancer STRAT4 sia stato importato nel software.

In questa sezione vengono riportati i passaggi predefiniti per il funzionamento del sistema GeneXpert. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello di strumento utilizzato.

Nota I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema.

1. Accendere lo strumento GeneXpert.
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Dx, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software GeneXpert si avvierà automaticamente, oppure potrebbe essere necessario fare doppio clic sull'icona del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
 - oppure
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Infinity, accenderlo. Il software Xpertise si avvierà automaticamente, oppure potrà essere necessario fare doppio clic sull'icona del software Xpertise sul desktop di Windows.
2. Connettersi al software del sistema di strumentazione GeneXpert usando il proprio nome utente e la password. Nella finestra del sistema GeneXpert, fare clic su **Crea analisi (Create Test)** (GeneXpert Dx) oppure fare clic su **Orders (Ordini)** e **Order Test (Ordina test)** (Infinity). Si aprirà la finestra Crea analisi (Create Test).
3. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID campione (Sample ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra Visualizza risultati (View Results) così come su tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo Esegui scansione del codice a barre della cartuccia (Scan Cartridge Barcode).
4. Eseguire la scansione del codice a barre sulla cartuccia Xpert Breast Cancer STRAT4. Verrà visualizzata la finestra Crea analisi (Create Test). Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: Selezione saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge SN).
5. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Invia (Submit)** (Infinity). Immettere la password, se richiesto.
6. Per lo strumento GeneXpert Dx:
 - a) Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
 - b) Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
 - c) Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo. Rimuovere la cartuccia.
 - d) Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori dei rifiuti di campioni di analisi attenendosi alla prassi standard del proprio presidio. Vedere la Sezione 9.

oppure

Per il sistema GeneXpert Infinity, posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia viene caricata automaticamente, il test viene eseguito e la cartuccia usata viene quindi collocata nel contenitore dei rifiuti.

13 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni dettagliate su come visualizzare e stampare i risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda dello strumento utilizzato.

1. Fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)** per visualizzare i risultati.
2. A completamento del test, fare clic sul pulsante **Rapporto (Report)** nella schermata Visualizza risultati (View Results) per visualizzare e/o generare un file del rapporto in formato PDF.

Nota

Se si utilizza il software ONCore per generare un rapporto, consultare la Guida per l'utente del software GeneXpert ONCore sul CD della Guida per l'utente di ONCore per istruzioni sulla metodologia di generazione di un rapporto. Fare inoltre riferimento alle istruzioni sui rapporti ONCore sul CD di Xpert Breast Cancer STRAT4 per istruzioni su come interpretare il rapporto ONCore per il test Xpert Breast Cancer STRAT4.

14 Controllo qualità

Ogni test contiene un controllo del gene di riferimento (*CYFIP1*) e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

- **Controllo *CYFIP1***: questo gene di riferimento viene usato per normalizzare i livelli di espressione di *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67*. Serve anche come controllo dell'adeguatezza dei campioni (SAC) per garantire che il campione

contenga RNA sufficiente. Per un risultato del test valido è necessario un segnale *CYFIP1* minimo. Un segnale *CYFIP1* al di sotto del livello minimo o un segnale negativo indica che il campione non contiene RNA sufficiente.

- ***CYFIP1* alternativo:** si tratta di un controllo *CYFIP1* duplicato utilizzato nell'algoritmo quando il valore delta del ciclo soglia (dCt) di PGR o *MKi67* è al di sotto dell'impostazione di cutoff del saggio. Per questi bersagli è necessario un segnale alternativo di *CYFIP1* minimo aggiuntivo per assicurare un risultato valido del test.
- **Controllo per la verifica della sonda (PCC):** Prima che inizi la PCR, il sistema di strumentazione GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsferi, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti. Il PCC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- **Controlli esterni (non forniti):** I controlli esterni devono essere usati in conformità ai requisiti degli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti.

15 Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpretati automaticamente dal sistema di strumentazione GeneXpert tramite i segnali fluorescenti misurati e gli algoritmi di calcolo incorporati, e sono chiaramente visualizzati nelle schede Risultati (Test Result) e Risultato analita (Analyte Result) della finestra Visualizza risultati (View Results). Il Risultato del test (Test Result) e il Risultato dell'analita (Analyte Result) vengono anche indicati nel Rapporto di analisi (Test Report). I risultati possibili sono riportati nella Tabella 1 e nella Tabella 2.

Tabella 1. Tutti i risultati possibili del test Xpert Breast Cancer STRAT4

Risultato visualizzato	CYFIP1	CYFIP1 alternativo	CIC
<i>ESR1</i> POSITIVO (<i>ESR1</i> POSITIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>ESR1</i> NEGATIVO (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>PGR</i> POSITIVO (<i>PGR</i> POSITIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>PGR</i> NEGATIVO (<i>PGR</i> NEGATIVE)	AMMESSO (PASS)	POS	POS o NEG
<i>ERBB2</i> POSITIVO (<i>ERBB2</i> POSITIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>ERBB2</i> NEGATIVO (<i>ERBB2</i> NEGATIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>MKi67</i> POSITIVO (<i>MKi67</i> POSITIVE)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	POS o NEG
<i>MKi67</i> NEGATIVO (<i>MKi67</i> NEGATIVE)	AMMESSO (PASS)	POS	POS o NEG
<i>PGR</i> INCERTO (PGR INDETERMINATE)	AMMESSO (PASS)	NEG	POS o NEG
<i>MKi67</i> INCERTO (<i>MKi67</i> INDETERMINATE)	AMMESSO (PASS)	NEG	POS o NEG
RIPETI ANALISI (REPEAT TEST)	AMMESSO (PASS)	POS o NEG	NEG
NON VALIDO (INVALID)	RESPINTO (FAIL)	NEG	POS o NEG
ERRORE (ERROR)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

Tabella 2. Xpert Breast Cancer STRAT4 – Risultati rappresentativi e interpretazione

Risultato	Interpretazione
<p>ESR1 POSITIVO (ESR1 POSITIVE)</p> <p>Vedere la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>ESR1</i> è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) superiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>PGR POSITIVO (PGR POSITIVE)</p> <p>Vedere la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>PGR</i> è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) superiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>ERBB2 POSITIVO (ERBB2 POSITIVE)</p> <p>Vedere la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>ERBB2</i> è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) superiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>MKI67 POSITIVO (MKI67 POSITIVE)</p> <p>Vedere la Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>MKI67</i> è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) superiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>ESR1 NEGATIVO (ESR1 NEGATIVE)</p> <p>Vedere la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>ESR1</i> non è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) inferiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>PGR NEGATIVO (PGR NEGATIVE)</p> <p>Vedere la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>PGR</i> non è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) inferiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS; <i>CYFIP1</i> ha un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Risultato	Interpretazione
<p>ERBB2 NEGATIVO (ERBB2 NEGATIVE)</p> <p>Vedere la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>ERBB2</i> non è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) inferiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>MKi67 NEGATIVO (MKi67 NEGATIVE)</p> <p>Vedere la Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il trascritto dell'mRNA <i>MKi67</i> non è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (dCt) inferiore all'impostazione di cutoff. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS; <i>CYFIP1</i> ha un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>PGR incerto (PGR Indeterminate)</p> <p>Vedere la Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA <i>PGR</i> a causa di insufficienza del materiale contenuto nel campione. Ripetere il test usando un lisato più concentrato. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG; il valore Ct del <i>CYFIP1</i> non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore all'impostazione della soglia necessaria per la determinazione dello stato del PGR. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>MKi67 incerto (MKi67 Indeterminate)</p> <p>Vedere la Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA <i>MKi67</i> a causa di insufficienza del materiale contenuto nel campione. Ripetere il test usando un lisato più concentrato. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG; il valore Ct di <i>CYFIP1</i> non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore all'impostazione della soglia necessaria per la determinazione dello stato di MKi67. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>RIPETI ANALISI (REPEAT TEST)</p> <p>Vedere la Figura 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA di <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Ripetere l'analisi usando un'aliquota di lisato del campione FFPE messo da parte in precedenza. • <i>CYFIP1</i> – AMMESSO (PASS); il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS/NEG; il trascritto dell'mRNA <i>CYFIP1</i> è stato rilevato. Il trascritto può avere o meno un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • CIC – NEG; il controllo interno ha un valore Ct al di fuori del range di validità. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Risultato	Interpretazione
NON VALIDO (INVALID)	<ul style="list-style-type: none"> ● NON VALIDO (INVALID) – Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA di <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> a causa di insufficienza del materiale contenuto nel campione. Ripetere il test usando un lisato più concentrato. ● <i>CYFIP1</i> - RESPINTO (FAIL); il valore Ct <i>CYFIP1</i> non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata. ● <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG, il valore Ct <i>CYFIP1</i> non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata. ● Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
ERRORE (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> ● Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA di <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Ripetere l'analisi usando un'aliquota di lisato del campione FFPE messo da parte in precedenza. ● <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativo – NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda – AMMESSO*/RESPINTO (PASS*/FAIL); uno o tutti i risultati della verifica della sonda non sono validi. <p>* Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore è derivato dal superamento del limite massimo di pressione rispetto al range accettabile, da un errore di adattamento della curva oppure dal guasto di un componente del sistema.</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> ● Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA di <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test. Una simile evenienza si verifica, per esempio, se l'operatore ha interrotto l'esecuzione di un test in corso. Ripetere l'analisi usando il lisato del campione FFPE messo da parte in precedenza. ● <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativo – NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda – NA (non applicabile)

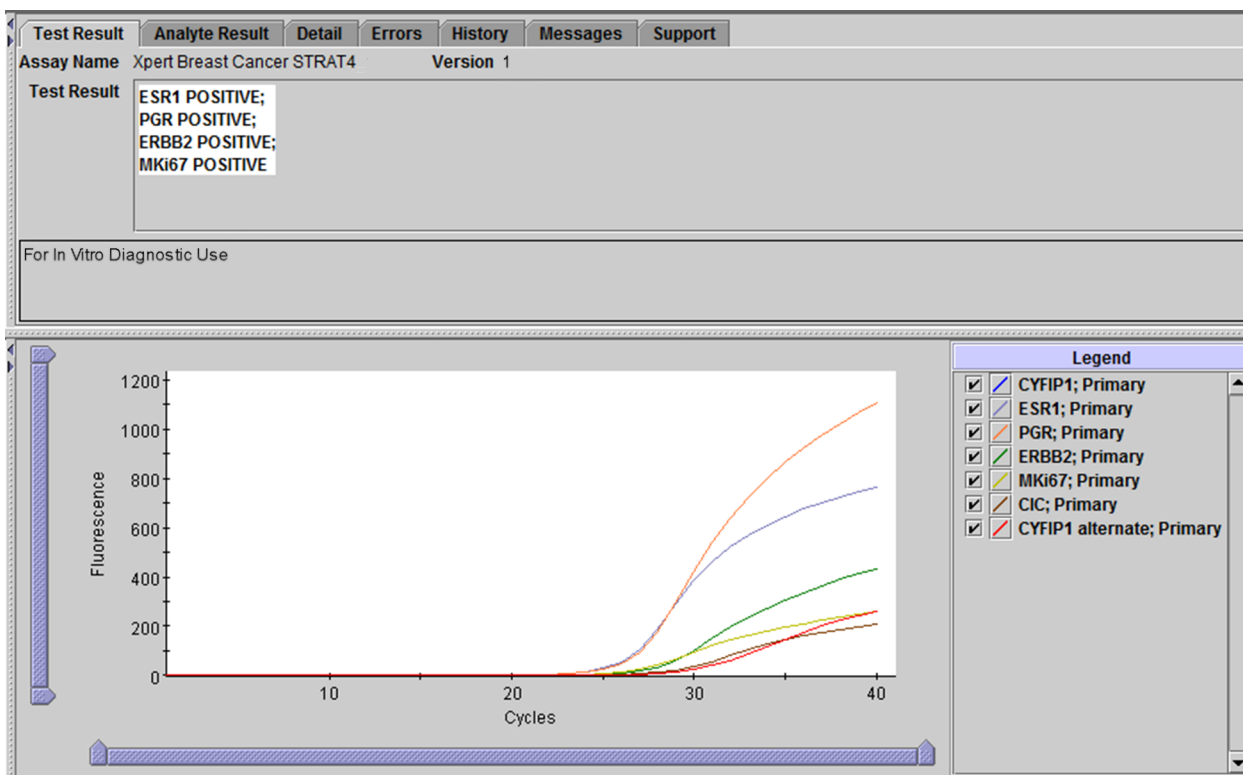


Figura 2. Finestra Visualizza risultati di GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKI67 POSITIVO

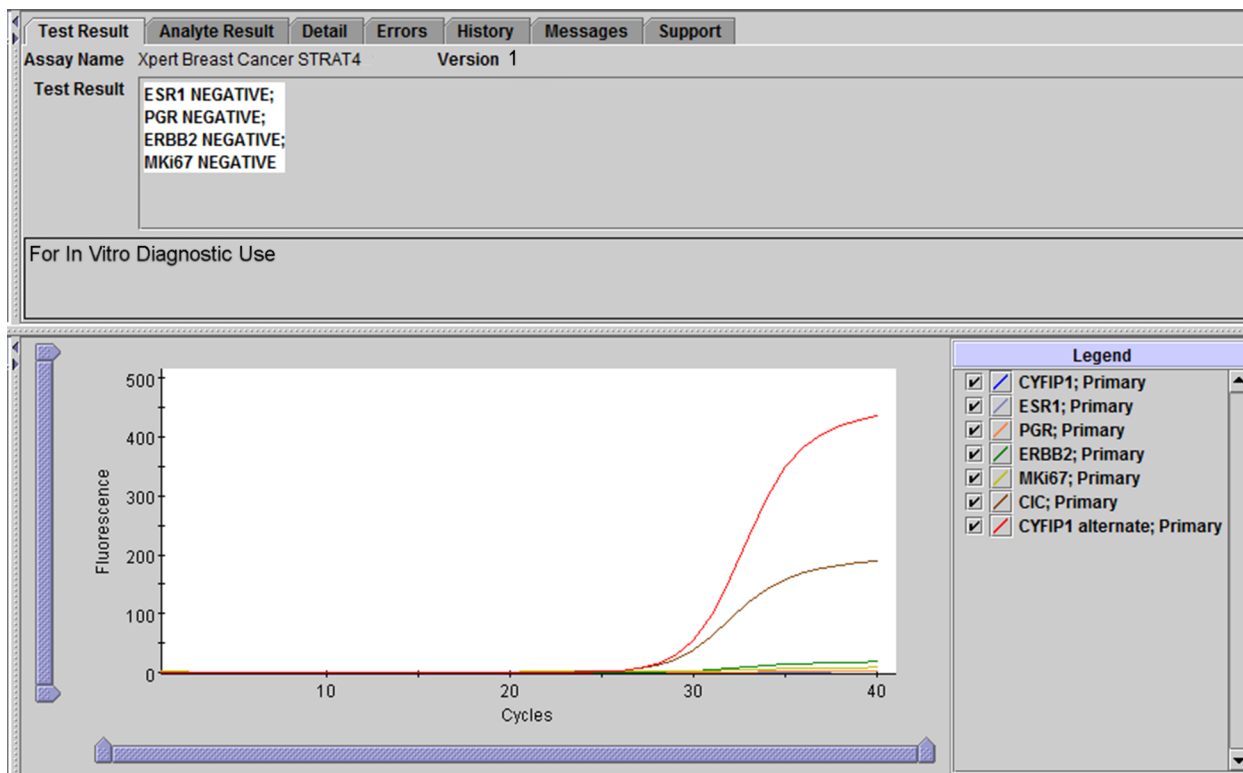


Figura 3. Finestra Visualizza risultati di GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKI67 NEGATIVO

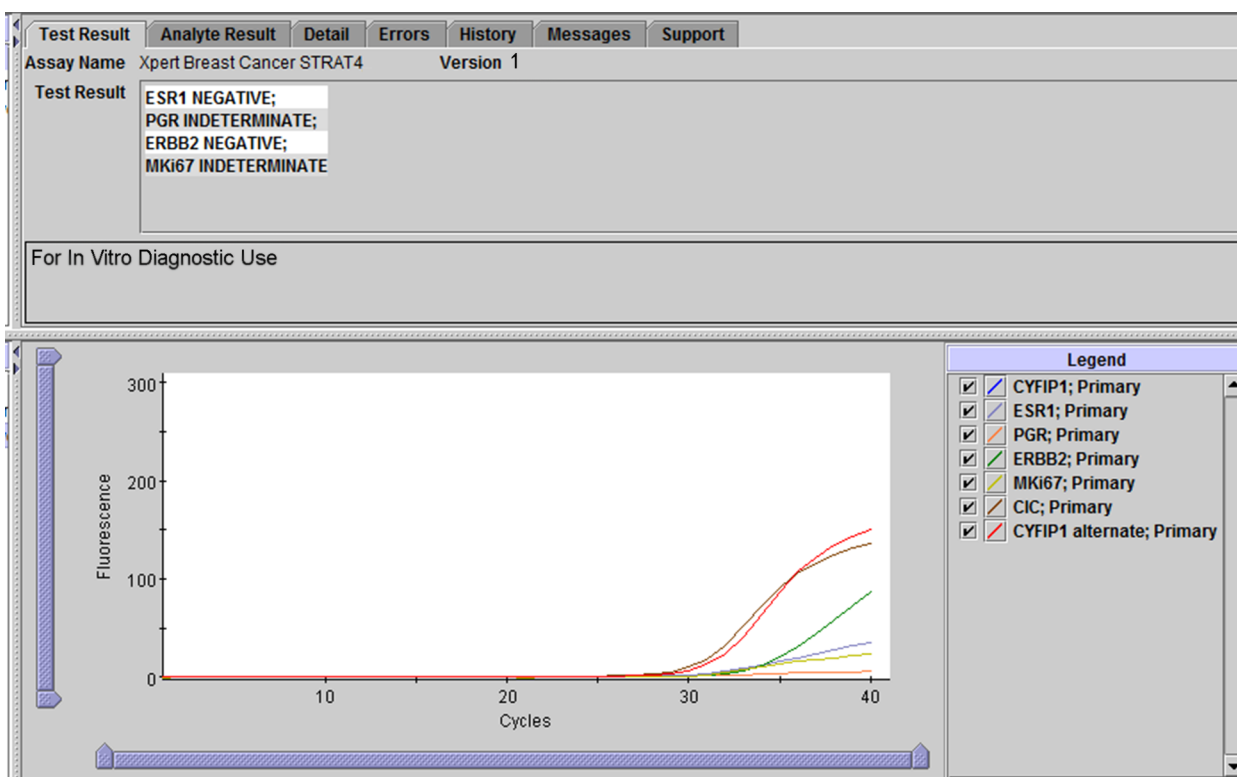


Figura 4. Finestra Visualizza risultati di GeneXpert Dx: PGR/MKI67 INCERTO

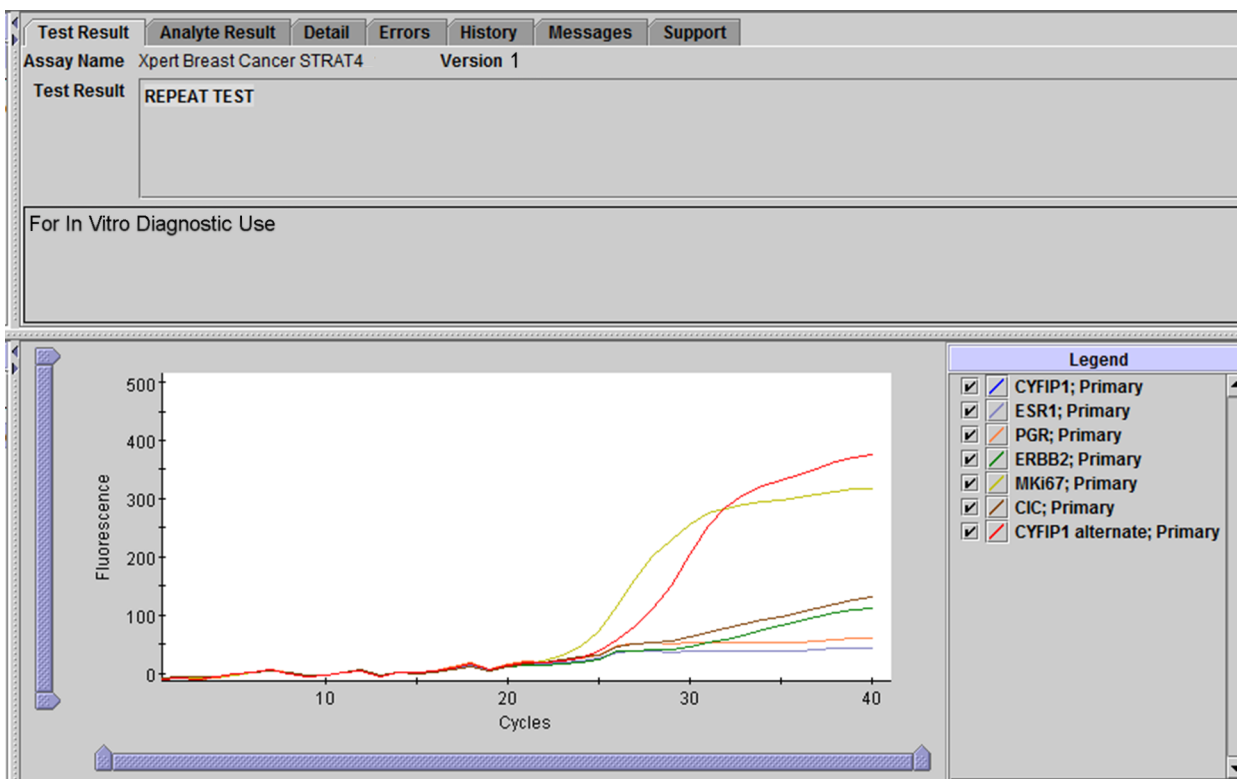


Figura 5. Finestra Visualizza risultati di GeneXpert Dx: RIPETI ANALISI (REPEAT TEST)

16 Motivi per ripetere il test

Ripetere il test con una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia).

- Un risultato indicante **RIPETI ANALISI (REPEAT TEST)** significa che il controllo interno è stato respinto. Il campione non è stato trattato correttamente. In tal caso, ripetere il test con una nuova aliquota da 520 µl dello stesso lisato FFPE.
- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che il controllo di riferimento è stato respinto. Il campione non è stato trattato correttamente, la PCR è stata inibita o la qualità dell'RNA del tumore utilizzato era inadeguata. In tal caso, ripetere il test con un lisato FFPE più concentrato, come da istruzioni per l'uso dell'FFPE Lysis Kit.
- Il risultato **ERRORE (ERROR)** indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda del reagente, del superamento dei limiti massimi di pressione o dell'individuazione di un errore di posizionamento della valvola. In tal caso, ripetere il test con una nuova aliquota da 520 µl dello stesso lisato FFPE.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test che era in esecuzione oppure si è verificata un'interruzione di alimentazione. In tal caso, ripetere il test con una nuova aliquota da 520 µl dello stesso lisato FFPE.
- Se il controllo qualità esterno non sortisce l'esito desiderato, ripetere il test di controllo esterno e/o contattare Cepheid per ricevere assistenza.

17 Limitazioni

- Qualsiasi modifica apportata a queste procedure può alterare le prestazioni del test. I risultati del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 vanno interpretati unitamente ad altri dati clinici e di laboratorio che il medico ha a disposizione.
- Le prestazioni del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 sono state convalidate utilizzando le procedure fornite nelle presenti istruzioni per l'uso e utilizzando campioni di analisi FFPE di età compresa tra 5 e 10 anni.
- Le prestazioni del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 sono state convalidate solo tramite le procedure fornite nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Risultati erronei del test possono derivare da operazioni di raccolta, manipolazione o conservazione improprie dei campioni di analisi o dallo scambio accidentale dei campioni. Per evitare risultati errati, è necessario attenersi scrupolosamente alle presenti istruzioni per l'uso.
- Le caratteristiche prestazionali non sono state definite per i pazienti di età inferiore a 25 anni.
- Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono comportare risultati erronei ma credibili per *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67*.

18 Caratteristiche prestazionali

18.1 Prestazioni cliniche

Le caratteristiche prestazionali del test Xpert Breast Cancer STRAT4 sono state valutate in relazione ai risultati IHC per ER, PR, HER2 e Ki67 e all'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) per l'amplificazione del gene HER2 in centri negli USA e in Europa. Inizialmente, nello studio erano stati inclusi 211 campioni di analisi FFPE residui deidentificati di carcinoma della mammella primitivo invasivo, provenienti dagli USA e dall'Europa, escludendone successivamente 10 a causa di tumore insufficiente ai fini del test e uno a causa di revoca del consenso. Era quindi disponibile un totale di 200 campioni per l'inclusione nelle analisi dei dati. Con ciascun campione di analisi FFPE sono stati preparati diversi vetrini per l'analisi Xpert; per l'analisi IHC di ER, PR, HER2 e Ki67; e per l'analisi FISH dell'amplificazione del gene HER2.

Complessivamente, Xpert Breast Cancer STRAT4 ha fornito risultati validi al primo tentativo di analisi per il 99,5% (199/200) dei campioni di analisi dello studio. Un campione di analisi che inizialmente aveva fornito un risultato non determinato (**ERRORE [ERROR]**, **NON VALIDO [INVALID]** o **NESSUN RISULTATO [NO RESULT]**) ha fornito un risultato dopo una singola ripetizione dell'analisi. Il tasso complessivo di riuscita del saggio è stato del 100,0% (200/200).

Dei 200 campioni di analisi con risultati Xpert validi, le analisi ESR1 e ERBB2 hanno dato risultati positivi o negativi validi il 100% delle volte (200/200). Per le analisi PGR e MKi67, Xpert ha dato risultati positivi o negativi validi nel 98,5% (197/200) e nel 97,0% (194/200) dei casi, rispettivamente. I 7 campioni di analisi con risultati Xpert incerti per PGR e/ o MKi67 sono stati rianalizzati usando il metodo del lisato FFPE concentrato. Nella Tabella 3 sono mostrati sia i risultati originali (primo tentativo) che quelli della ripetizione dell'analisi.

Per l'intero dataset, compresi i risultati della ripetizione dell'analisi, il saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 ha dimostrato una percentuale di concordanza positiva (PPA) del 97,2%, una percentuale di concordanza negativa (NPA) del 95,0% e una percentuale di concordanza complessiva (OPA) del 97,0% per ESR1 in relazione a IHC;¹⁸ una PPA dell'88,4%, una NPA del 90,7% e una OPA dell'88,9% per PGR in relazione a IHC;¹⁸ una PPA del 100,0%, una NPA del 92,4% e una OPA del 93,3% per ERBB2 in relazione a IHC;¹⁹ e una PPA del 100%, una NPA del 92,0% e una OPA del 93,3% per ERBB2 in relazione a HER2 FISH.¹⁹ Per MKi67, la PPA è dell'88,8%, la NPA del 100% e la OPA del 90,7% con la soglia IHC impostata su >20% per i risultati positivi e su <10% per i risultati negativi. I campioni di analisi MKi67 IHC intermedi (soglia 10%-20% inclusa) sono stati esclusi dall'analisi. I valori complessivi di PPA, NPA e OPA per ciascun bersaglio sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. Prestazioni cliniche

Confronto	Set di dati ^a	Totale (n) ^b	PPA	IC al 95%	NPA	IC al 95%	OPA	IC al 95%
ESR1/ER Xpert vs. IHC	Originale	199	97,2% (174/179)	93,6-98,8	100% (20/20)	83,9-100	97,5% (194/199)	94,3-98,9
	Ripetizione dell'analisi	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	Originale	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
	Ripetizione dell'analisi	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	Originale	180	100% (22/22)	85,1-100	92,4% (146/158)	87,2-95,6	93,3% (168/180)	88,7-96,1
	Ripetizione dell'analisi	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	Originale	178	100% (28/28)	87,9-100	92,0% (138/150)	86,5-95,4	93,3% (166/178)	88,6-96,1
	Ripetizione dell'analisi	178	100% (28/28)	87,9-100	92,0% (138/150)	86,5-95,4	93,3% (166/178)	88,6-96,1
ERBB2/HER2 Xpert vs. IHC +FISH	Originale	197	100% (27/27)	87,5-100	91,2% (155/170)	86,0-94,6	92,4% (182/197)	87,8-95,3
	Ripetizione dell'analisi	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	Originale	148	88,7% (110/124)	81,9-93,2	100% (24/24)	86,2-100	90,5% (134/148)	84,7-94,3
	Ripetizione dell'analisi	151	88,8% (111/125)	82,1-93,2	100% (26/26)	87,1-100	90,7% (137/151)	85,0-94,4

^a Originale = lisato 1X in base alle istruzioni per l'uso; Ripetizione dell'analisi = risultato della ripetizione con lisato concentrato 4X nei casi in cui il campione di analisi originale (lisato 1X) abbia prodotto un risultato incerto per PGR e/o MKi67.

^b Sono stati esclusi i campioni di analisi con risultati Xpert non determinati o incerti, quelli con risultati IHC equivoci o intermedi e quelli con analisi IHC non riuscita e FISH non riuscita.

19 Prestazioni analitiche

19.1 Sensibilità analitica e input di saggio minimo

L'input di saggio minimo è stato determinato valutando il Ct CYFIP1 massimo (gene di riferimento) che determina con accuratezza la quantità input di campione necessaria per prestazioni del saggio ottimali. Tale quantità garantisce risultati validi per la maggior parte dei campioni clinici FFPE analizzati. I campioni con valore Ct CYFIP1 maggiore di quello consentito generano un risultato NON VALIDO (INVALID).

La sensibilità analitica e l'input di saggio minimo per il test Xpert Breast Cancer STRAT4, definiti come Ct CYFIP1 massimo con $\geq 95\%$ di risultati validi, sono stati stabiliti usando diluizioni dei lisati del campione clinico FFPE per verificare il Ct CYFIP1. Per valutare la sensibilità del Ct CYFIP1, un lisato del campione clinico FFPE è stato diluito serialmente e

analizzato con N=20 replicati per livello di diluizione nel corso di 3 giorni fino a ottenere $\leq 95\%$ di risultati di analisi validi. I livelli di diluizione hanno incluso un campione di analisi all'input di saggio minimo previsto, due livelli al di sotto e due al di sopra. Le analisi sono state effettuate su due lotti di cartucce Xpert Breast Cancer STRAT4.

Prima dell'inizio dello studio, il limite di analisi in bianco è stato definito con N=60 replicati usando due lotti indipendenti di cartucce Xpert Breast Cancer STRAT4. Il limite del campione in bianco consisteva in una sezione di paraffina in bianco (senza campione di tessuto) e tutti i risultati di analisi hanno mostrato i risultati previsti NON VALIDI (). Le diluizioni seriali in rapporto 1:1000 della quantità di input del campione clinico di tessuto FFPE hanno dato valori di Ct CYFIP1 validi 20 volte su 20, con un Ct medio uguale a 33,4 e 0,6 DS dal lotto 1 del test Xpert Breast Cancer STRAT4 e un Ct medio uguale a 33,6 e 0,5 DS dal lotto 2. Ulteriori diluizioni con valori Ct CYFIP1 successivi non hanno soddisfatto il requisito del $\geq 95\%$ di risultati validi per lo studio. La Tabella 4 riepiloga il numero di sessioni di analisi valide per ciascun livello di input del campione diluito serialmente in termini di diluizione relativa o Ct CYFIP1 medio. La sensibilità analitica con due lotti di cartucce del test Xpert Breast Cancer STRAT4 ha dimostrato il requisito di input di saggio minimo per un Ct CYFIP1 uguale a 33,4. Questo valore, abbinato alla variabilità del saggio, consentirebbe di impostare il limite superiore del Ct CYFIP1 a 35 per il test Xpert Breast Cancer STRAT4.

Tabella 4. Input di saggio minimo di Xpert Breast Cancer STRAT4

Lotto di kit	Input di campione (diluizione relativa)	Ct CYFIP1 medio	DS	N. sessioni valide (Ct ≤ 35)
00801 (lotto 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/A	N/A	0/20
00903 (lotto 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/A	N/A	0/20

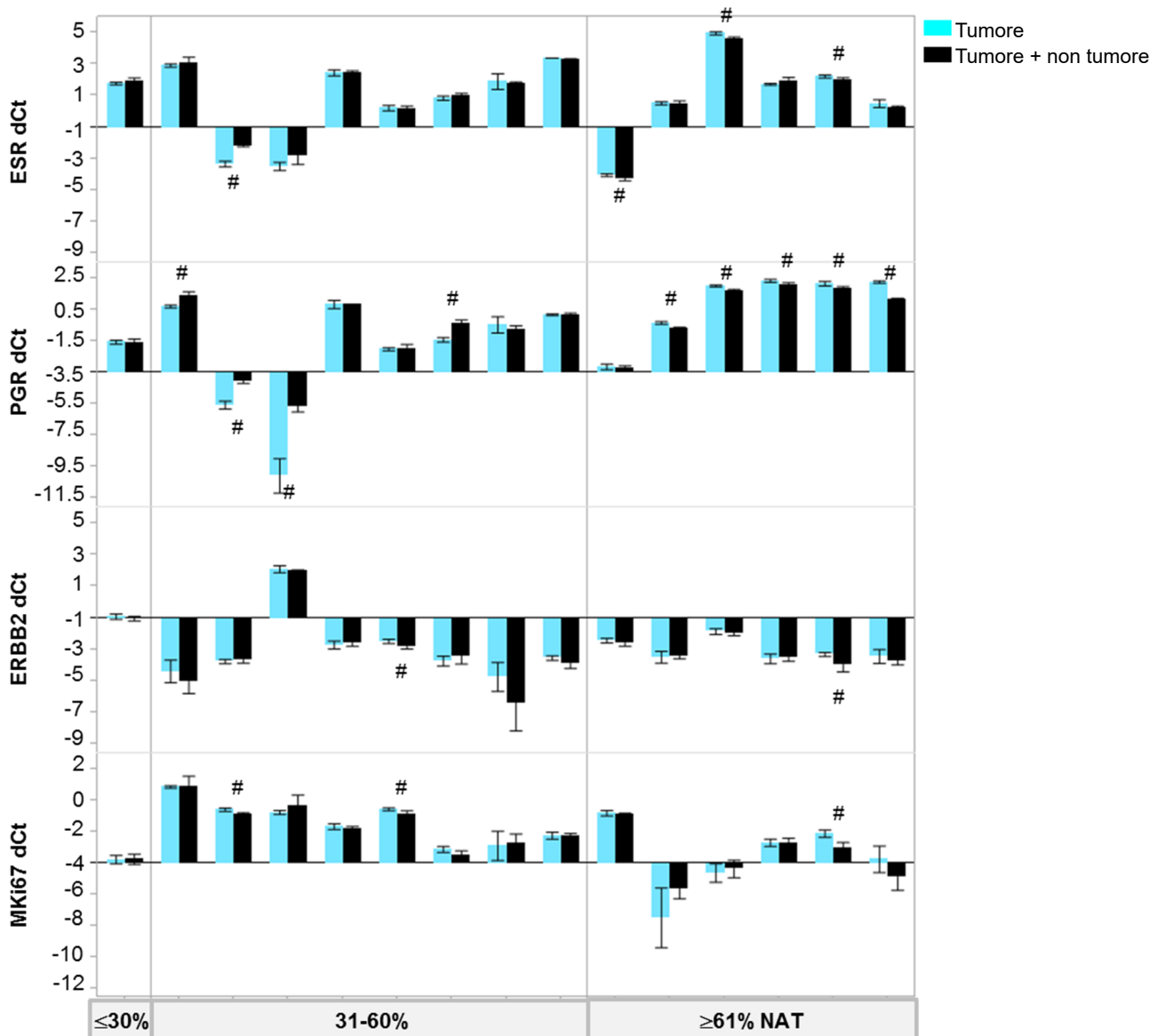
19.2 Test di interferenza

Tessuto adiacente normale, non tumorale

Nei campioni di analisi di tessuto carcinomatoso della mammella sono comunemente presenti tessuti adiacenti normali (non tumorali) (NAT) con valenza di contaminanti capaci di interferire con il rilevamento del bersaglio specifico. Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 può richiedere la macrodissezione di una sezione FFPE di tumore mammario verificata patologicamente al fine di ridurre al minimo i potenziali effetti dei contaminanti non tumorali nei casi applicabili, secondo quanto determinato da un patologo. Per valutare gli effetti dei tessuti adiacenti normali non tumorali, quindici (15) blocchetti di tessuto FFPE con carcinoma mammario invasivo, contenenti una percentuale di NAT circostante compresa fra il 21% e il 98%, sono stati analizzati con il test Xpert Breast Cancer STRAT4 con e senza macrodissezione. L'analisi Xpert Breast Cancer STRAT4 è stata eseguita con N=4 replicati dello stesso lisato per ciascuna condizione. I valori dCt di ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 per ciascun campione di tessuto con macrodissezione (grafico a barre azzurro) o senza macrodissezione (grafico a barre nero) sono stati inizialmente valutati con il metodo ANOVA a una via per determinare l'interferenza statistica del NAT. L'eventuale interferenza del NAT è stata considerata clinicamente significativa quando il Ct delta-delta (ddCt) tra i campioni sottoposti e non sottoposti a macrodissezione era $>1,0$ e quando si è rilevata un'alterazione nel risultato del test. I risultati dello studio sono riepilogati nella Figura 6.

I valori dCt di ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 di tutti e 15 i campioni sono stati raggruppati in base alla percentuale di NAT ($\leq 30\%$, 31-60% o $\geq 61\%$). Le barre verticali azzurre e nere con DS nel grafico rappresentano i valori dCt medi bersaglio di N=4 replicati di sezioni di un blocchetto di carcinoma della mammella invasivo FFPE sottoposte e non sottoposte a macrodissezione. Tutti e 15 i blocchetti FFPE (N=1 sotto il 30% di NAT, N=8 fra il 31% e il 60% di NAT, e N=6 al di sopra del 60% di NAT) hanno dimostrato assenza di interferenza statisticamente significativa del tessuto adiacente normale non tumorale in base alle analisi ANOVA a una via con valore $p \geq 0,05$; oppure hanno dimostrato assenza di significanza clinica (contrassegnata da #) quando la variazione dei valori Ct delta di ciascun bersaglio nei campioni sottoposti a macrodissezione in rapporto a quelli non sottoposti a macrodissezione è stata $\leq 1,0$ o quando i risultati dei test bersaglio (positivi, negativi) sono rimasti inalterati.

Figura 6. Interferenza del tessuto adiacente normale/non tumorale con i valori dCt bersaglio del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4



Tessuti di carcinoma duttale in situ, necrotici ed emorragici

Per valutare gli effetti dei tessuti di carcinoma duttale in situ (DCIS), necrotici ed emorragici, il test Xpert Breast Cancer STRAT4 è stato utilizzato per analizzare con e senza macrodissezione un totale di 9 campioni di tumore mammario FFPE (3 blocchetti di tumore mammario FFPE contenenti DCIS per il 3-61%, 3 blocchetti FFPE contenenti tessuto necrotico per il 10-65% e 3 blocchetti FFPE contenenti tessuto emorragico per il 15-41%). Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 è stato eseguito con N=4 replicati dello stesso lisato per ciascuna condizione. In tutte le suddette condizioni di analisi con il test Xpert Breast Cancer STRAT4, non è stato rilevato alcun impatto statistico o clinicamente significativo da parte delle diverse contaminazioni di tessuti DCIS, necrotici ed emorragici (dati in forma grafica non presentati in questa sede).

DNA genomico umano (hgDNA)

Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 si avvale di primer e sonde altamente specifici per ibridare in modo efficiente template ricavati da un pool di acidi nucleici genomici (DNA genomico umano = hgDNA) con mRNA di ESR1, PGR, ERBB2, e MKI67 bersaglio. Per valutare gli effetti dell'hgDNA sul test Xpert Breast Cancer STRAT4, sono stati sottoposti a macrodissezione e analizzati 10 blocchetti di tumore mammario FFPE con vario contenuto di cellule di carcinoma duttale invasivo; usando il test Xpert Breast Cancer STRAT4 sono stati analizzati N=4 replicati dello stesso lisato del campione

FFPE per ciascuna condizione, con e senza l'aggiunta di 25 ng di hgDNA. In tutte le suddette condizioni di analisi, non è stato rilevato alcun impatto statistico o clinicamente significativo dovuto all'interferenza dell'hgDNA (dati in forma grafica non presentati in questa sede).

19.3 Contaminazione da trascinamento

È stato condotto uno studio per dimostrare che l'impiego delle cartucce chiuse monouso GeneXpert riduce al minimo la contaminazione da carry-over (trascinamento) nelle sessioni analitiche di campioni negativi, successive a sessioni con campioni caratterizzati da valori positivi molto elevati all'interno dello stesso modulo GeneXpert. Lo studio consisteva nel trattamento di un campione negativo all'interno dello stesso modulo GeneXpert subito dopo un campione ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 altamente positivo. Il campione negativo consisteva in RNA trascritto *in vitro* (IVT) contenente trascritto CYFIP1 a una concentrazione di 5×10^4 copie per garantire la presenza di un gene di riferimento bersaglio. Il campione altamente positivo consisteva in RNA IVT contenente trascritto CYFIP1, a una concentrazione di 5×10^5 copie, e RNA IVT contenente trascritti ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 a 5×10^6 copie, preparati come lisato FFPE. Questo schema di analisi è stato ripetuto 41 volte su un singolo modulo GeneXpert per un totale di 20 campioni di analisi altamente positivi e 21 campioni negativi. Tutti e 20 i campioni altamente positivi sono stati correttamente refertati come ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVO (POSITIVE) e tutti e 21 i campioni negativi sono stati correttamente refertati come ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVO (NEGATIVE).

19.4 Precisione e riproducibilità del saggio

La riproducibilità del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 è stata valutata usando un pannello con cinque campioni di analisi lisati.

Tre elementi del pannello sono stati preparati aggiungendo RNA trascritto *in vitro* (IVT) a tampone di lisi FFPE inoculato entro ~2 dCt rispetto ai valori di cutoff delta Ct per ESR1 (1-IVT RNA), PGR (2-IVT RNA) ed ERBB2 (3-IVT RNA), e con valori Ct CYFIP1 ~2-3 Ct rispetto al livello di input del saggio minimo.

Due elementi del pannello (4-Campione clinico FFPE e 5-Campione clinico FFPE) sono stati creati ciascuno da pool di campioni clinici FFPE in tampone di lisi FFPE per generare valori Ct CYFIP1 prossimi all'input del saggio minimo e per avere valori di cutoff delta Ct per tutti i bersagli nel range refertabile e, per quanto possibile, prossimi ai valori di cutoff delta Ct del saggio.

Due operatori presso ciascuno dei tre centri di studio hanno analizzato due pannelli di cinque campioni al giorno per sei giorni di analisi (cinque campioni x sei giorni x due operatori x due replicati x tre centri). È stato analizzato un totale di 72 replicati per campione. Tre lotti di cartucce Xpert Breast Cancer STRAT4 sono stati utilizzati presso ciascuno di questi tre centri di analisi. Il test Xpert Breast Cancer STRAT4 è stato eseguito secondo la procedura riportata nelle presenti istruzioni per l'uso.

La riproducibilità del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 è stata valutata in termini di dCt per ciascuno dei quattro bersagli di ogni pannello. La media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) tra i siti, tra i lotti, tra i giorni, tra gli operatori e all'interno dei saggi per ciascun elemento del pannello sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Riepilogo dei dati di riproducibilità

Campione	Canale del saggio (analita)	N ^a	Media dCt	Tra centri		Tra lotti		Tra giorni		Tra operatori		All'interno del saggio		Totale	
				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-Campione clinico FFPE	ESR1	72	-0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,40	0,00	15,90	0,02	69,70	0,03	0,17
	PGR	72	-1,99	0,00	6,30	0,01	19,70	0,00	2,50	0,00	0,00	0,02	71,60	0,03	0,18
	ERBB2	72	-2,39	0,02	31,30	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00	3,70	0,05	62,80	0,07	0,27
	MKI67	72	-0,93	0,00	0,00	0,02	36,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	63,50	0,04	0,21
5-Campione clinico 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 Risultati con valori delta Ct validi su 72.

20 Riferimenti bibliografici

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC) e OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità). 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, Stamatakis M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84:219-225.

10. Fasching PA, Heusinger K, Haerberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C, Schulz-Wendtland R, Bani MR, Schrauder M, Kahmann L, Lux MP, Strehl JD, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Wachter DL. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 Nov 14; 11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
11. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008 Aug;17(4):323-34.
12. de Matos LL, 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. REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.
17. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
18. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 (134).
19. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 (138), 241-256.

21 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale globale

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Assistenza Tecnica

Prima di contattare il Supporto Tecnico di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome del prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio del computer

Stati Uniti




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















Francia

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

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Supporto Tecnico di Cepheid sono disponibili nel sito www.cepheid.com/en/support/contact-us.

23 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Marchio CE - Conformità europea

Simbolo	Significato
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Non riutilizzare
	Codice lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Fabbricante
	Paese di produzione
	Contenuto sufficiente per n test
	Controllo
	Data di scadenza
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore



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 Cronologia delle revisioni

Sezione	Descrizione della modifica
Tabella dei simboli	Aggiunta dei simboli CH REP e Importatore e aggiunta di descrizioni nella tabella dei simboli. Aggiunta dei simboli CH REP e Informazioni sull'importatore con l'indirizzo svizzero.
Cronologia delle revisioni	Aggiornamento della tabella Cronologia delle revisioni.