

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Bruksanvisning

IVD CE

Erklæringer om varemerke, patenter og opphavsrett

Cepheid[®], Cepheid-logoen, GeneXpert[®] og Xpert[®] er varemerker for Cepheid, registrert i USA og andre land.

Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere.

KJØP AV DETTE PRODUKTET OVERFØRER TIL KJØPEREN EN IKKE-OVERFØRBAR RETT TIL Å BRUKE DET I SAMSVAR MED DENNE BRUKSANVISNINGEN. INGEN ANDRE RETTIGHETER OVERFØRES EKSPLISITT, IMPLISITT ELLER VED «ESTOPPEL». VIDERE OVERFØRES DET IKKE NOEN RETTIGHETER TIL VIDERESALG MED KJØP AV DETTE PRODUKTET.

© 2017-2023 Cepheid.

Se Revisjonshistorikk, for en beskrivelse av endringer.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr

1 Proprietært navn

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Vanlig navn

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Tiltenkt bruk

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en polymerasekjedereaksjonbasert semikvantitativ analyse med kvalitative avskjæringsverdier for mRNA-er for østrogenreseptor (*ESR1*), progesteronreseptor (*PGR*), human epidermal vekstfaktorreseptor 2 (*ERBB2/HER2*) og celledelingsmarkøren Ki-67 (*MKi67*) isolert fra formalinfiksert og parafininnkapslet (FFPE) invasiv brystkreft-vev. RNA-et ekstraheres fra et tumorberiket område av et vevssnitt for mikroskop som identifisert av en patolog. Testen brukes sammen med andre kliniske data og laboratoriedata for å klassifisere brystkreftvev vedrørende deres hormonreseptorstatus, HER2-reseptorstatus og celledelingsmarkørstatus. Testen er beregnet brukt med GeneXpert[®]-systemet, som inkluderer RNA-isolering fra FFPE-vev samt amplifikasjon og deteksjon av målsekvenser i patronen.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er ikke tiltenkt som:

- En prediktor for sykdommens alvorlighet
- En enkeltstående enhet for diagnostisk testing av brystkreft
- En prognostikator for tilbakevendende sykdom

Indikasjoner for bruk: Testen er tiltenkt brukt ved vurdering av mRNA-nivåene av *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67* i invasiv brystkreft-vev innhentet fra pasienter og klargjort som FFPE-prøver, og som et hjelpemiddel ved klinisk evaluering sammen med andre laboratoriedata.

4 Oppsummering og forklaring

Brystkreft er en av de vanligste kreftformene hos kvinner på verdensbasis, med cirka 1,7 millioner nye tilfeller av brystkreft hvert år.¹ I Europa diagnostiseres cirka 494 000 nye tilfeller hvert år, og 143 000 pasienter vil dø av sykdommen. I USA ble det diagnostisert cirka 200 000 nye tilfeller av invasiv brystkreft i 2015.² Brystkreft er den vanligste årsaken til kreftmortalitet blant kvinner i u-land og den nest vanligste årsaken til kreftmortalitet (etter lungekreft) blant kvinner i i-land.²

Hos kvinner er brystkreft den vanligst diagnostiserte kreftformen og den fremste årsaken til kreftdødsfall.¹ Brystkreftmortalitet er redusert med 34 prosent siden 1990, stort sett på grunn av bedre behandling og tidlig oppdagelse.³ Målinger av ER- og PR-proteinuttrykk er prognostiske for utfall av brystkreft, og de forutsier respons på tamoxifen og andre hormonbehandlinger.^{4,5,6,7} HER2-overuttrykk gir en negativ prognose hos kvinner med brystkreft, men enda viktigere, respons på trastuzumab eller andre behandlinger rettet mot HER2 forutsies av proteinoveruttrykk av HER2 (*ERBB2*) eller amplifikasjon av HER2-genet.⁸ Celledelingsmarkøren Ki-67 (*MKi67*) har blitt studert i bredt omfang i retrospektive studier som omfatter brystkreftpasienter⁹, og anses som en viktig indikator for behovet for behandling med cellegift.¹⁰ Metaanalyser har vist at det er forbundet med lavere overlevelse i tidlig brystkreft.¹¹ Gitt hvor viktige disse markørene er

ved valg av et effektivt behandlingsprogram for en pasient med brystkreft, anbefaler behandlingsretningslinjene til European Society for Medical Oncology (ESMO) at alle primære brystkarsinomer testes for ER, PR, HER2 (ERBB2) og Ki67 ved diagnosetidspunktet.¹²

Immunhistokjemi (IHC) brukes ofte for måling av proteinuttrykk av ER, PR, HER2 og Ki67. For HER2-uttrykk er IHC typisk den første testen som utføres, og resultatene rapporteres på en skala fra 0 til 3+. Hvis resultatet er tvetydig for HER2-uttrykk (2+), sendes prøven til en HER2 in situ-hybridisering (ISH)-analyse, som fluorescens in situ-hybridisering (FISH) eller kromogen in situ-hybridisering (CISH) som ser etter amplifikasjon av HER2-genet.¹³ Det er vist en høy grad av variasjon i resultatene for IHC og ISH når de sammenlignes på tvers av laboratorier, stort sett på grunn av forskjeller i antistoffene som brukes for IHC, samt subjektivitet i tolkningsmetoder.¹⁴

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en in vitro diagnostisk test brukt til å bestemme mRNA-uttrykksnivåene til *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67* isolert fra FFPE-prøver av invasiv brystkreft-vev.

Analysen utføres i en selvstendig reagenskasset etter et kort eksternt klargjøring av prøvelysat-trinn og krever mindre enn 15 minutter manuell tid med en total behandlingstid på mindre enn 2 timer.

5 Prosedyrens prinsip

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen er en sanntids -polymerasekjedereaksjon (PCR)-analyse for deteksjon av mRNA-er for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67* isolert fra formalinfiksert og parafininnkapslet (FFPE) invasivt brystvev. Analysen utføres på Cepheid GeneXpert-instrumentssystemene. GeneXpert Instrument-systemene automatiserer og integrerer rensing av prøver, amplifikasjon av nukleinsyre og deteksjon av målsekvensen i enkle eller komplekse prøver ved bruk av sanntids RT-PCR. Systemene består av et instrument, en strekkodeskanner, en datamaskin og forhåndsinstallert programvare for å kjøre tester og vise resultatene. Systemene bruker GeneXpert-patroner til engangsbruk som inneholder RT-PCR-reagensene, og hvor RT-PCR-prosessen utføres. Se den relevante operatørhåndboken for GeneXpert-instrumentssystemet for en fullstendig beskrivelse av systemene.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen inkluderer reagenser for samtidig deteksjon av *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, et cytoplasmisk FMR1-interagerende protein 1 (*CYFIP1*) referanseggen, en intern RT-PCR-kontroll (*CIC*) og en intern probekontroll (*PCC*). Referanseggen verifiserer tilstrekkelig prøve og brukes til å normalisere mRNA-uttrykksnivåene for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*. Den interne RT-PCR-kontrollen (*CIC*) brukes til å verifisere at RT-PCR-reaksjonen gikk riktig for seg. *PCC* verifiserer reagensperlerehydrering, RT-PCR-rørfylling i patronen, probeintegritet og fargestoffstabilitet i patronen. Analysen bruker totalt seks distinkte fluorescenskanaler for deteksjon av mål eller kontroll/referanse med sine egne avskjæringsparametre for gyldighet av mål/kontroll/referanse.

FFPE-prøvene må først behandles med Xpert® FFPE-lyseringssettet ved å preparere et 4–5 µm tykt vevssnitt hvor FFPE-vevet først makrodissekeres, om nødvendig, for å anrike området med invasiv tumor, og deretter skrapes og plasseres i et rør sammen med den anbefalte mengden FFPE-lyseringsreagens og proteinase K. Løsningen inkuberes deretter i en varmeblokk ved 80 °C i 30 minutter. Deretter blandes etanol med prøven, og den anbefalte mengden av det klargjorte prøvelysatet tilsettes deretter direkte i en testpatron. Testpatronen settes inn i en modul i et GeneXpert instrumentssystem hvor rensing, amplifikasjon og sanntidsdeteksjon av nukleinsyre er helautomatisert og fullstendig integrert i systemet. Alle reagensene som trengs for prøveklargjøring og RT-PCR-analyse i systemet, er forhåndslastet i patronen. Nukleinsyrene i lysatet fanges på et filter, vaskes og elueres med sonikering. Den rensede nukleinsyren blandes med tørre RT-PCR-reagenser, og løsningen overføres til reaksjonsrøret for RT-PCR og deteksjon. Tiden det tar å få et resultat, er cirka 75 minutter i GeneXpert.

Avskjæringene for deteksjon som Xpert Breast Cancer STRAT4-testen bruker i hver fluorescenskanal, ble etablert for å maksimere positivt, negativt og totalt samsvar i prosent sammenlignet med referanselaboratorieresultatene med IHC eller IHC/FISH for hvert mål. IHC for ER, PR, Ki67 og HER2 samt FISH for HER2 ble prosessert og scoret i henhold til instruksjonene i bruksanvisningen. Tolkning av -resultater ble fullført i henhold til retningslinjene i ASCO/CAP 2013.¹⁵ Tumorer ble klassifisert som ER eller PR IHC-positiv når $\geq 1\%$ av invasiv tumor-celler viste definitiv nukleær farging, uavhengig av fargingens intensitet. HER2-uttrykket ble evaluert med HercepTest (IHC)-settet (Dako) og scoret som 0, 1+, 2+ eller 3+. Tumorer scoret som 2+ ble sendt til HER2 FISH med PathVysion HER2 DNA-probesett (Vysis-Abbott, Chicago, IL, USA). Tilfeller ble ansett som HER2-positiv hvis scoret 3+ med IHC og/eller amplifisert med FISH (definert som HER2:CEP17 (forhold $\geq 2,0$), og/eller gjennomsnittlig HER2-kopiantall $\geq 6,0$ signaler/celle i henhold til 2013 ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update for HER2 Testing in Breast Cancer.¹⁵ For Ki67 ble tumorer klassifisert som positive (høy) når $\geq 20\%$ av invasiv tumor-celler viste definitiv nukleær farging, uavhengig av fargingens intensitet.

Når det gjelder referanseggenkontrollen og den interne RT-PCR-kontrollen, definerer avskjæringene for deteksjon områder med minimum og maksimum syklusterskel (*Ct*) PCR-verdier som bestemmer et gyldig resultat, en tilstrekkelig minimum prøveinngang, og ingen PCR-hemming. Når det gjelder målene for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*, defineres avskjæringene for deteksjon av verdier for deltasyklusterskel (*dCt*) (referanseggenets *Ct* minus målgenets *Ct*) som bestemmer POSITIV (POSITIVE) kontra NEGATIV (NEGATIVE) resultater for et gitt mål i en kanal.

6 Reagenser og instrumenter

6.1 Materialer som følger med

Xpert Breast Cancer STRAT4-settet inneholder tilstrekkelig reagenser til å prosessere 10 kvalitetskontrollprøver eller FFPE-lysater klargjort med Xpert FFPE Lysis Kit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Xpert Breast Cancer STRAT4-settet inneholder følgende:

Xpert Breast Cancer STRAT4-reagenskassetter med integrerte reaksjonsrør	10
<ul style="list-style-type: none"> • Perle 1, 2 og 3 (frysetørket) • Skyllereagens • Elueringsreagens 	<ul style="list-style-type: none"> 1 per reagenskasset 1,0 ml per reagenskasset 2,0 ml per reagenskasset
CD	1 per sett
<ul style="list-style-type: none"> • Analysedefinisjonsfil (ADF) • Bruksanvisning • ONCore rapportfiler 	

Merk Sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig på www.cepheid.com eller www.cepheidinternational.com på fanen **STØTTE (SUPPORT)**

Merk Det bovine serumalbuminet (BSA) i perlene i dette produktet er utelukkende produsert av bovint plasma fra USA. Intet drøvtyggerprotein eller annet animalsk protein ble gitt til dyrene; dyrene besto testing ante og post mortem. Det var ingen blanding av materialet med andre animalske materialer under behandlingen.

7 Oppbevaring og håndtering

- Oppbevar Xpert Breast Cancer STRAT4-settets innhold ved 2–28 °C.
- Ikke åpne lokket på patronen før du er klar til å utføre testing.
- Bruk patronen innen 30 minutter etter at lokket åpnes.
- Ikke bruk en patron som har lekket.

8 Nødvendige materialer som ikke følger med

- Xpert FFPE-lyseringssett (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10) for klargjøring av FFPE-lysate. Dette settet inneholder FFPE lyseringsreagens, proteinase K (PK), 1,5 ml rør og 5 ml flasker.
- Vortex-blander.
- Pipetter og pipettespisser med aerosolfilter som egner seg for å pipettere 600 µl, 1,2 µl og 520 µl.
- Datamaskin med proprietær GeneXpert-programvare versjon 4.7b eller nyere eller Xpertise versjon 6.4b eller nyere, strekkodeskanner og relevant operatørhåndbok for GeneXpert instrumentsystem.
- Skriver: Hvis det er behov for en skriver, kontaktes Cepheids tekniske brukerstøtte for å arrangere kjøp av en anbefalt skriver.

9 Advarsler og forholdsregler

- Kun til *in vitro* diagnostisk bruk.
- Alle biologiske prøver skal behandles som om de er i stand til å overføre smittsomme agenser. Alle humane prøver skal behandles med standard forholdsregler. Retningslinjer for håndtering av prøver er tilgjengelig fra Verdens helseorganisasjon eller U.S. Centers for Disease Control and Prevention.
- Følg institusjonens sikkerhetsprosedyrer for arbeid med kjemikalier og håndtering av biologiske prøver.
- Ytelseegenskapene til denne testen er etablert med prøvetypen som er oppført i Avsnitt 3. Ytelsen til denne analysen med andre prøvetyper eller prøver er ikke evaluert.

- FFPE-vev må prosesseres med Xpert FFPE-lyseringssettet (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Ufullstendig fjerning (skraping) av tumorområdet fra objektglasset for klargjøring av FFPE-lysatet kan føre til utilstrekkelig materiale for analysen og derfor en høyere enn forventet andel ubestemmelig/ugyldig med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.
- Ikke åpne Xpert Breast Cancer STRAT4-patronens lokk unntatt når du tilsetter klargjort FFPE-lysat.
- Ikke bruk en patron som har falt etter at den ble tatt ut av emballasjen.
- Ikke rist patronen. Hvis patronen ristes eller faller etter at patronens lokk er åpnet, kan den gi ugyldige resultater.
- Ikke bruk en patron som har et skadet reaksjonsrør.
- Hver Xpert Xpert Breast Cancer STRAT4-patron til engangsbruk brukes til å prosessere én test. Brukte patroner skal ikke gjenbrukes.
- Ikke bruk en patron hvis den ser våt ut, eller hvis lokkets forsegling ser ut til å ha blitt brutt.
- Ikke plasser prøve-ID-etiketten på patronens lokk eller på strekkodeetiketten.
- God laboratoriepraksis, inkludert bytte av hansker mellom håndtering av pasientprøver, anbefales for å unngå kontaminasjon av prøver eller reagenser.
- Konsulter institusjonens miljøavfallspersonell om riktig avhending av brukte patroner og ubrukte reagenser. Kontroller lokale forskrifter siden de kan avvike fra nasjonale avhendingsforskrifter. Materialet kan utvise egenskaper til farlig avfall som har spesifikke avhendingskrav. Institusjoner skal kontrollere sine krav for avhending av farlig avfall.

10 Kjemiske farer^{16,17}

I henhold til det globalt harmoniserte systemet for klassifisering og merking (GHS) anses dette materialet ikke som farlig.

11 Prøvetaking og transport og oppbevaring av prøver

- Brukes kun med FFPE-prøver prosessert med Xpert FFPE Lysis Kit (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Følg ASCO/CAP-retningslinjer¹⁵ for klargjøring av FFPE-vev.
- FFPE-lysat skal klargjøres fra FFPE tumorblokken med det største området med levedyktig brystkarsinom (minst 30 % tumorceller), og manuell makrodisseksjon skal utføres, om nødvendig, før testing i Xpert Breast Cancer STRAT4-testen. For tumorprøver mindre enn 10 mm² med mindre enn 30 % tumor kan det være nødvendig å bruke prosedyren med konsentrert lysat eller mer enn ett 4–5 µm snitt for å oppnå gyldige resultater.
- FFPE-lysat skal transporteres til laboratoriet ved 2–8 °C.
- FFPE-lysat er holdbart opptil 1 uke ved 2–8 °C eller 4 uker ved ≤ -20 °C før testing med Xpert Breast Cancer STRAT4. Oppbevar ved -80 °C for langtidsoppbevaring. Det anbefales ikke mer enn 1 fryse-tine-syklus. Ved tining tiner du til romtemperatur og vortex-blander FFPE-lysatet i 15 sekunder før bruk.

12 Prosedyre

Viktig Bruk av Xpert Breast Cancer STRAT4-patronen krever klargjøring av et lysat med Xpert FFPE-lyseringssettet (katalognr. GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Viktig Start analysen innen 30 minutter etter at den klargjorte prøven er tilsatt i patronen.

12.1 Klargjøre FFPE-lysatet

Klargjør FFPE-lysat i henhold til bruksanvisningen for FFPE-lyseringssettet.

12.2 Klargjøre patronen

1. Ta patronen ut av pappemballasjen.
2. Vortex-bland klargjort FFPE-lysat i 15 sekunder før bruk.
3. Åpne lokket på patronen.
4. Bruk en pipette til å overføre 520 µl FFPE-lysat til patronens prøvekommer. (Merk: Det kan være en liten mengde presipitat til stede, som ikke påvirker analysens ytelse.)

Oppbevar resterende FFPE-lysat ved 2–8 °C eller ≤ -20 °C i tilfelle det må utføres en ny test.



Figur 1. Xpert Breast Cancer STRAT4-patron (sett ovenfra).

- Lukk lokket på patronen. Sørg for at lokket knepper skikkelig på plass.

12.3 Starte testen

Viktig Sørg for at analysedefinisjonsfilen (ADF) for Xpert Breast Cancer STRAT4 er importert i programvaren før testen startes.

Dette avsnittet inneholder standardtrinnene for å bruke GeneXpert-systemet. Se *operatørhåndboken for GeneXpert Dx-systemet* eller *operatørhåndboken for GeneXpert Infinity-systemet*, avhengig av instrumentet som brukes, for mer detaljerte instruksjoner.

Merk Trinnene du følger, kan avvike hvis systemadministratoren har endret systemets standard arbeidsflyt.

- Slå på GeneXpert-instrumentet:
 - Hvis GeneXpert Dx-instrumentet brukes, slå først på GeneXpert Dx-instrumentet og slå deretter på datamaskinen. GeneXpert-programvaren vil starte automatisk eller kan kreve at du dobbeltklikker på ikonet til GeneXpert Dx-programvaren på skrivebordet i Windows®.
 - eller
 - Hvis GeneXpert Infinity-instrumentet brukes, slå på instrumentet. Xpertise-programvaren vil starte automatisk eller kan kreve at du dobbeltklikker på ikonet til Xpertise-programvaren på skrivebordet i Windows.
- Logg på programvaren til GeneXpert instrumentsystemet med ditt brukernavn og passord. Klikk på **Opprett test (Create Test)** (GeneXpert Dx) eller klikk på **Bestillinger (Orders)** og **Bestill test (Order Test)** (Infinity) i vinduet til GeneXpert Dx-systemet. Vinduet Opprett test (Create Test) åpnes.
- Skann eller skriv inn prøve-ID-en. Hvis du skriver inn prøve-ID-en, må du passe på at den skrives inn riktig. Prøve-ID-en er knyttet til testresultatene og vises i vinduet Vis resultater (View Results) og alle rapporter. Dialogboksen Skann patron (Scan Cartridge) vises.
- Skann strekkoden på Xpert Breast Cancer STRAT4-patronen. Vinduet Opprett test (Create Test) vises. Programvaren bruker strekkodeinformasjonen til automatisk å fylle ut følgende felt: Velg analyse (Select Assay), Reagensparti-ID (Reagent Lot ID), Patronserienummer (Cartridge SN).
- Klikk på **Start test (Start Test)** (GeneXpert Dx) eller **Send (Submit)** (Infinity) i vinduet til GeneXpert Dx-systemet. Legg inn passordet hvis du blir bedt om det.
- For GeneXpert Dx-instrumentet:
 - Åpne luken med den blinkende grønne lampen på instrumentmodulen og last inn patronen.
 - Lukk luken. Testen starter, og den grønne lampen slutter å blinke. Når testen er ferdig, slukker lampen.
 - Vent til systemet frigjør låsen på luken før du åpner modulluken. Fjern patronen.
 - Kast brukte patroner i de riktige prøveavfallsbeholderne i samsvar med institusjonens standard praksis. Se Avsnitt 9.

eller

For GeneXpert Infinity-systemet plasseres patronen på transportbåndet. Patronen blir automatisk lastet inn, testen vil kjøre, og den brukte patronen vil plasseres i avfallsbeholderen.

13 Vise og skrive ut resultater

Dette avsnittet beskriver de grunnleggende trinnene for å vise og skrive ut resultater. Se *operatorhåndboken for GeneXpert Dx-systemet* eller *operatorhåndboken for GeneXpert Infinity-systemet*, avhengig av instrumentmodellen som brukes, for mer detaljerte instruksjoner vedrørende hvordan du viser og skriver ut resultatene.

1. Klikk på **Vis resultater (View Results)** -ikonet for å vise resultatene.
2. Når testen er ferdig, klikker du på knappen **Rapport (Report)** i vinduet Vis resultater (View Results) for å vise og/eller generere en PDF-rapportfil.

Merk

Hvis du bruker ONCore-programvaren til å generere en rapport, se brukerhåndboken til GeneXpert ONCore-programvaren på ONCore brukerhåndbok-CD-en for instruksjoner om hvordan du genererer en rapport. Se også rapportinstruksjonene for ONCore på Xpert Breast Cancer STRAT4-CD-en for instruksjoner om hvordan du tolker ONCore-rapporten for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.

14 Kvalitetskontroll

Hver test inneholder en referansegenkontroll (*CYFIP1*) og en probekontroll (PCC).

- **CYFIP1-kontroll:** Dette referansegenet brukes til å normalisere uttrykksnivåene for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*. Det fungerer også som en prøvetilstrekkelighetskontroll (SAC) som sikrer at prøven inneholder tilstrekkelig RNA. Det kreves et minimum *CYFIP1*-signal for et gyldig testresultat. Et *CYFIP1*-signal under minimumsmengden eller et negativt signal indikerer at prøven ikke inneholder tilstrekkelig RNA.
- **CYFIP1-alternativ:** Dette er en duplikat-*CYFIP1*-kontroll som brukes i algoritmen når deltasyklusterskelen (dCt) til *PGR* eller *MKi67* er under analysens avskjæringsinnstilling. For disse målene trengs det et tilleggs minimum *CYFIP1*-alternativsignal for å sikre et gyldig testresultat.
- **Probekontroll (PCC):** Før PCR starter, måler GeneXpert instrumentsystemet fluorescenssignalet fra probene for å overvåke rehydrering av perler, fylling av reaksjonsrør, probeintegritet og fargestoffstabilitet. PCC består hvis den oppfyller de validerte godkjenningsskriteriene.
- **Eksterne kontroller (følger ikke med):** Eksterne kontroller skal brukes i samsvar med lokale og nasjonale akkrediteringsorganisasjoners krav som relevant.

15 Tolkning av resultater

Resultatene tolkes automatisk av GeneXpert Instrument-systemet ut fra målte fluorescenssignaler og innebygde beregningsalgoritmer og vises tydelig i vinduet Vis resultater (View Results) på fanene Testresultater (Test Results) og Analytresultater (Analyte Results). Testresultater (Test Results) og Analytresultater (Analyte Results) vises også i Testrapporten (Test Report). De mulige resultatene vises i Tabell 1 og Tabell 2.

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

Resultat vist	CYFIP1	CYFIP1-alternativ	CIC
ESR1 POSITIV (<i>ESR1</i> POSITIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
ESR1 NEGATIV (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
PGR POSITIV (<i>PGR</i> POSITIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
PGR NEGATIV (<i>PGR</i> NEGATIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS	POS eller NEG

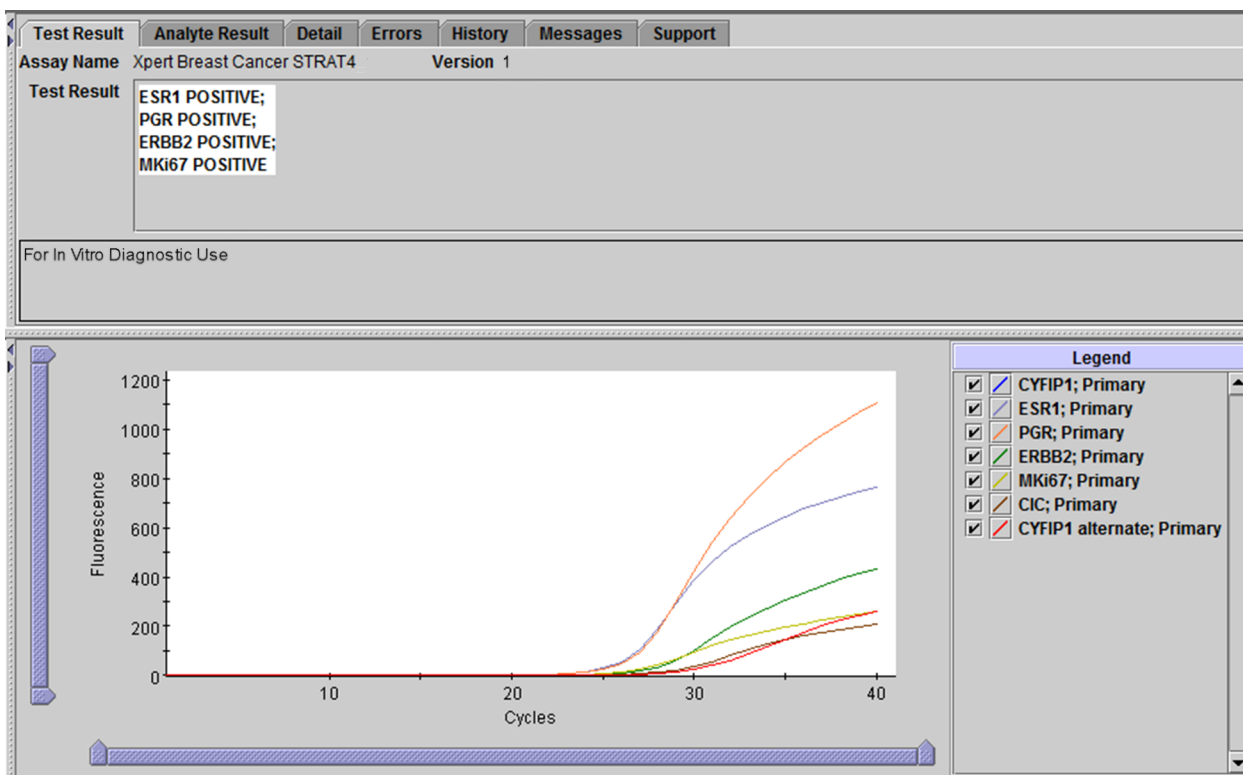
Resultat vist	CYFIP1	CYFIP1-alternativ	CIC
ERBB2 POSITIV (ERBB2 POSITIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
ERBB2 NEGATIV (ERBB2 NEGATIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
MKi67 POSITIV (MKi67 POSITIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
MKi67 NEGATIV (MKi67 NEGATIVE)	BESTÅTT (PASS)	POS	POS eller NEG
PGR UBESTEMMELIG (PGR INDETERMINATE)	BESTÅTT (PASS)	NEG	POS eller NEG
MKi67 UBESTEMMELIG (MKi67 INDETERMINATE)	BESTÅTT (PASS)	NEG	POS eller NEG
GJENTATT TEST (REPEAT TEST)	BESTÅTT (PASS)	POS eller NEG	NEG
UGYLDIG (INVALID)	IKKE BESTÅTT (FAIL)	NEG	POS eller NEG
FEIL (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)

Tabell 2. Representative resultater og tolkning for Xpert Breast Cancer STRAT4

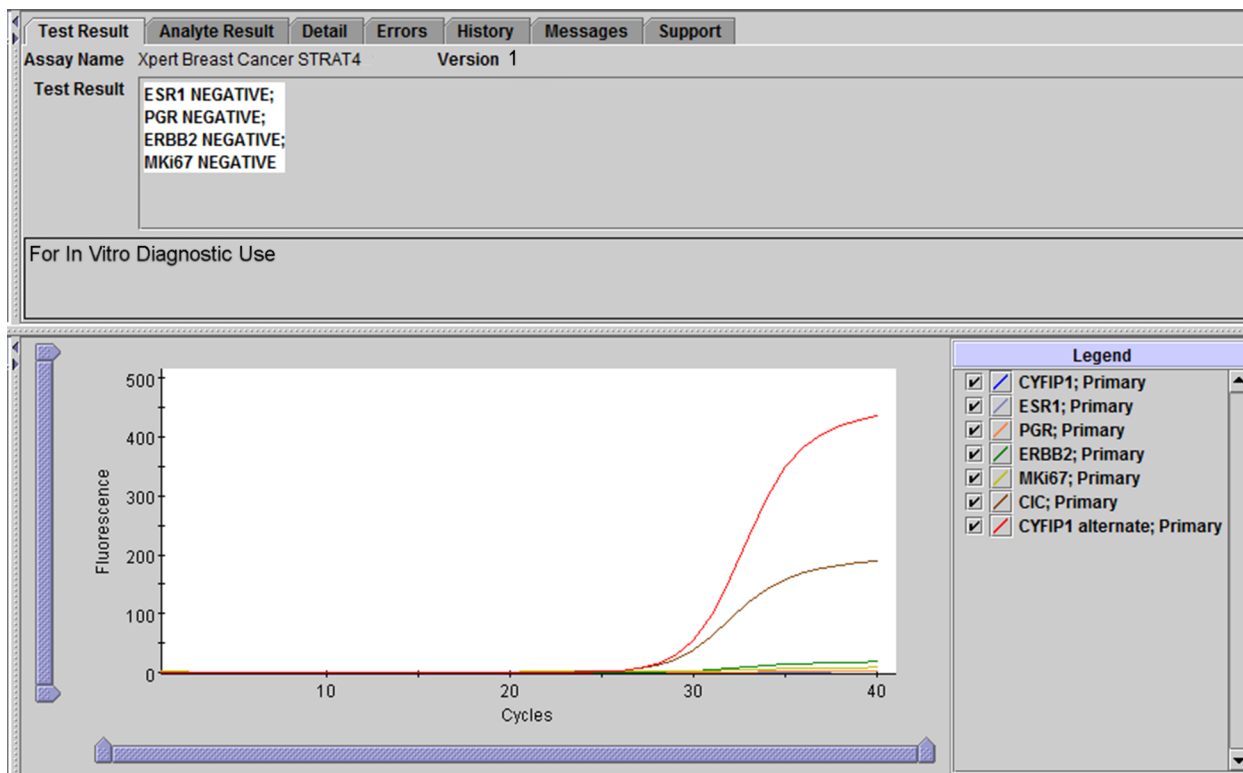
Resultat	Tolkning
<p>ESR1 POSITIV (ESR1 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i>-mRNA-transkriptet er overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) over avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>PGR POSITIV (PGR POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-transkriptet er overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) over avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>ERBB2 POSITIV (ERBB2 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i>-mRNA-transkriptet er overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) over avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>MKi67 POSITIV (MKi67 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-transkriptet er overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) over avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>ESR1 NEGATIV (ESR1 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i>-mRNA-transkriptet er ikke overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) under avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>PGR NEGATIV (PGR NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-transkriptet er ikke overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) under avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.

Resultat	Tolkning
<p>ERBB2 NEGATIV (ERBB2 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i>-mRNA-transkriptet er ikke overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) under avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>MKi67 NEGATIV (MKi67 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-transkriptet er ikke overuttrykt og har en deltasyklusterskel (dCt) under avskjæringsinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>PGR ubestemmelig (PGR Indeterminate)</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i>-mRNA-uttrykksnivået kan ikke bestemmes fordi prøven inneholder utilstrekkelig materiale. Gjenta testen med et mer konsentrert lysat. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; Syklusterskelen (Ct) til <i>CYFIP1</i> var ikke innenfor det gyldige området eller endepunktet var under terskelinnstillingen som er nødvendig for bestemmelse av PGR-status. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>MKi67 ubestemmelig (MKi67 Indeterminate)</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i>-mRNA-uttrykksnivået kan ikke bestemmes fordi prøven inneholder utilstrekkelig materiale. Gjenta testen med et mer konsentrert lysat. • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; Syklusterskelen (Ct) til <i>CYFIP1</i> var ikke innenfor det gyldige området eller endepunktet var under terskelinnstillingen som er nødvendig for bestemmelse av MKi67-status. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
<p>GJENTATT TEST (REPEAT TEST)</p> <p>Se Figur 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA-uttrykksnivåene for <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> kan ikke bestemmes. Gjenta testen med en aliquot av gjenværende FFPE-prøvelysat • <i>CYFIP1</i> – BESTÅTT (PASS); <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert og har en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – POS/NEG; <i>CYFIP1</i>-mRNA-transkript ble detektert. Transkriptet kan eller kan ikke ha en syklusterskel (Ct) innenfor det gyldige området og endepunkt over terskelinnstillingen. • CIC – NEG; internkontrollen har en syklusterskel (Ct) utenfor det gyldige området. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.

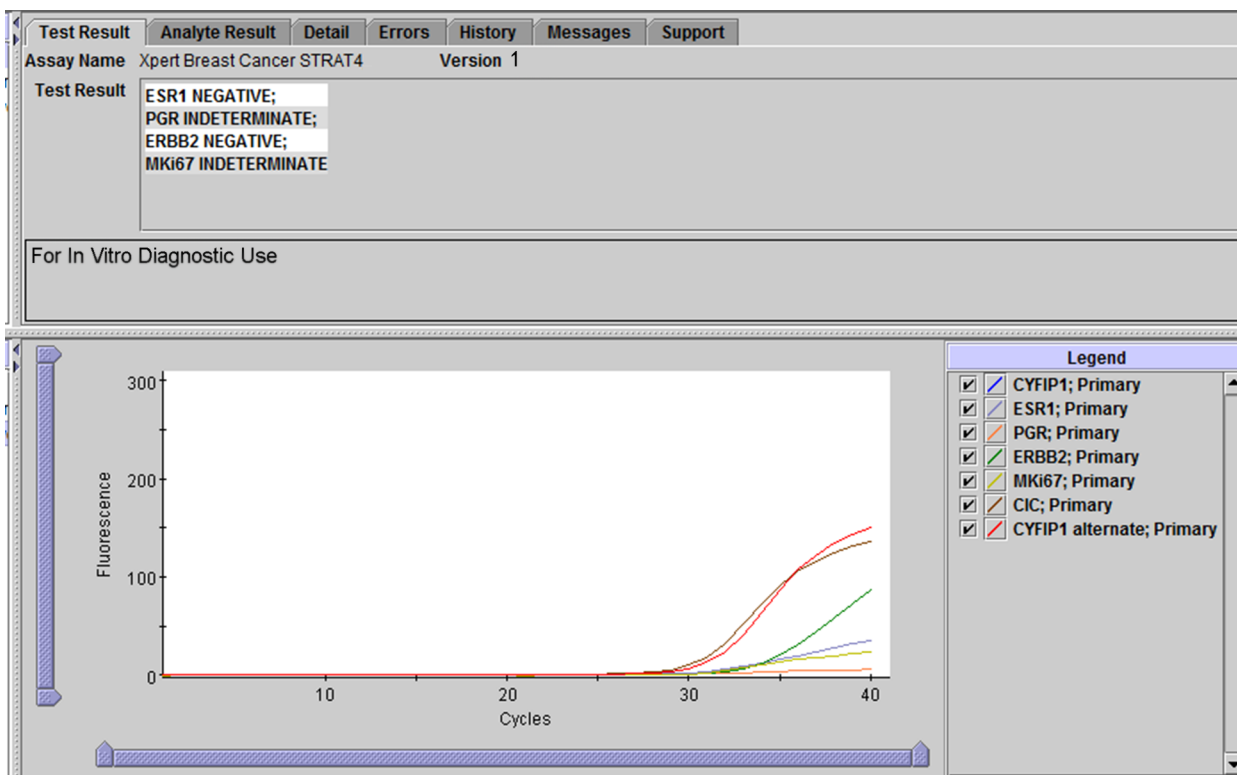
Resultat	Tolkning
UGYLDIG (INVALID)	<ul style="list-style-type: none"> • UGYLDIG (INVALID) – mRNA-uttrykksnivåene for <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> kan ikke bestemmes fordi prøven inneholder utilstrekkelig materiale. Gjenta testen med et mer konsentrert lysat. • <i>CYFIP1</i> – IKKE BESTÅTT (FAIL); Syklusterskelen (Ct) til <i>CYFIP1</i> var ikke innenfor det gyldige området, eller endepunktet var under terskelinnstillingen. • <i>CYFIP1</i>-alternativ – NEG; Syklusterskelen (Ct) til <i>CYFIP1</i> var ikke innenfor det gyldige området, eller endepunktet var under terskelinnstillingen. • Probekontroll – BESTÅTT (PASS); alle probekontrollresultater er bestått.
FEIL (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA-uttrykksnivåene for <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> kan ikke bestemmes. Gjenta testen med en allikvot av gjenværende FFPE-prøvelysat • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INTET RESULTAT (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i>-alternativ – INTET RESULTAT (NO RESULT) • Probekontroll – BESTÅTT (PASS)* / IKKE BESTÅTT (FAIL); alle eller ett av probekontrollresultatene er ikke bestått. <p style="margin-left: 40px;">* Hvis probekontrollen ble bestått, ble feilen forårsaket av at maksimal trykkgrense overskrider godkjenningsområdet, av en kurvetilpasningsfeil eller av en systemkomponentsvikt.</p>
INTET RESULTAT (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA-uttrykksnivåene for <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> kan ikke bestemmes. Det ble innhentet utilstrekkelig data for å produsere et testresultat. Dette kan for eksempel oppstå hvis operatøren stoppet en test mens den kjørte. Gjenta testen med gjenværende FFPE-prøvelysat. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INTET RESULTAT (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i>-alternativ – INTET RESULTAT (NO RESULT) • Probekontroll – IR (ikke relevant) (NA (not applicable))



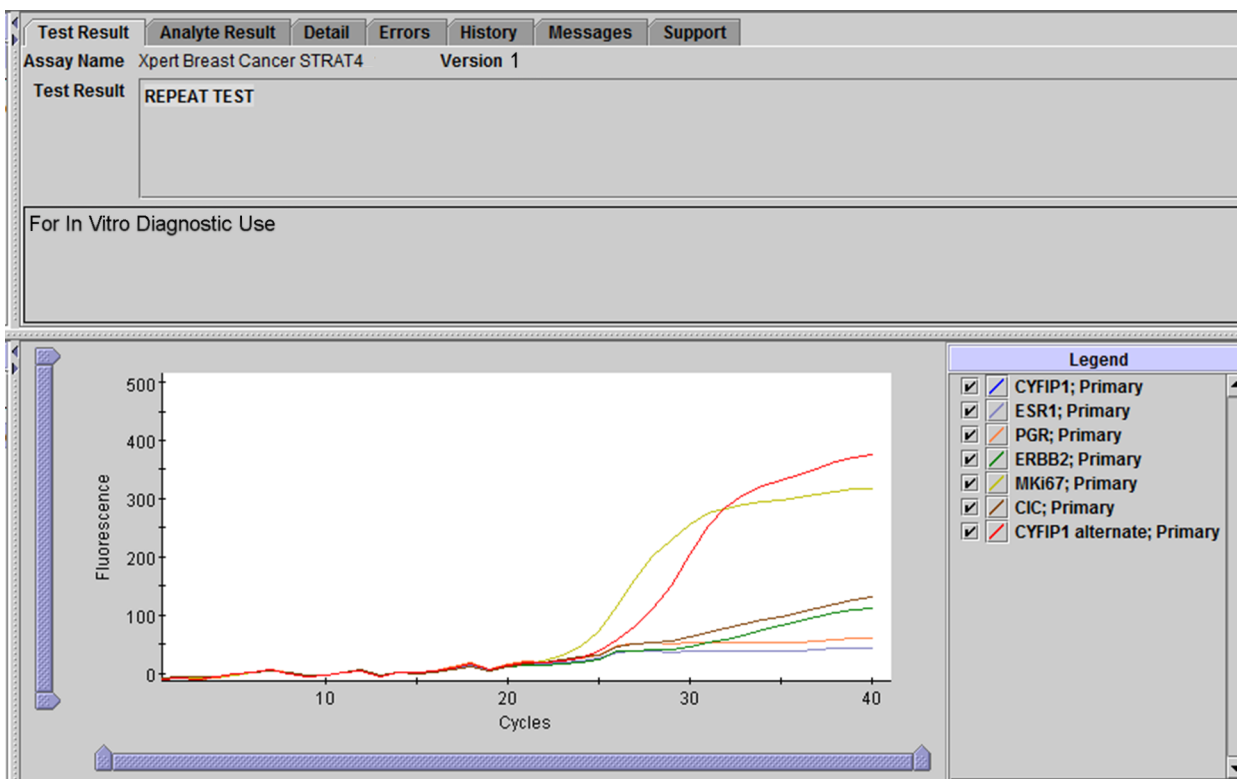
Figur 2. GeneXpert Dx-vinduet Vis resultater: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVE.



Figur 3. GeneXpert Dx-vinduet Vis resultater: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVE.



Figur 4. GeneXpert Dx-vinduet Vis resultater: MKi67 UBESTEMMELIG.



Figur 5. GeneXpert Dx-vinduet Vis resultater: GJENTATT TEST (REPEAT TEST)

16 Grunner til å gjenta testen

Gjenta testen med en ny patron (patronen skal ikke gjenbrukes).

- Et **GJENTA TESTEN (REPEAT TEST)** resultat indikerer at internkontrollen ikke besto. Prøven ble ikke prosessert skikkelig. I dette tilfellet gjentas testen med en ny 520 µl alikvot av det samme FFPE-lysatet.
- Et **UGYLDIG (INVALID)** resultat indikerer at referansekontrollen ikke besto. Prøven ble ikke prosessert skikkelig, PCR ble hemmet, eller tilgjengelige RNA-kvaliteten i tumoren var utilstrekkelig. I dette tilfellet gjentas testen med et mer konsentrert FFPE-lysat i henhold til instruksjonene i bruksanvisningen for FFPE-lyseringssettet.
- Et **FEIL (ERROR)** resultat indikerer at probekontrollen ikke besto, og at analysen ble avbrutt, muligens på grunn av at reaksjonsrøret ikke ble fylt riktig, et reagensprobeintegritetsproblem ble detektert, fordi maksimumsgrensene for trykk ble overskredet, eller en ventilposisjoningsfeil ble detektert. I dette tilfellet gjentas testen med en ny 520 µl alikvot av det samme FFPE-lysatet.
- Et **INTET RESULTAT (NO RESULT)** indikerer at det ble innhentet utilstrekkelige data. For eksempel at operatøren stoppet en test mens den kjørte, eller det oppsto strømbrudd. I dette tilfellet gjentas testen med en ny 520 µl alikvot av det samme FFPE-lysatet.
- Hvis en ekstern QC ikke presterer som forventet, gjentar du testen av den eksterne kontrollen og/eller kontakter Cepheid for hjelp.

17 Begrensninger

- Modifikasjoner av disse prosedyrene kan påvirke testens ytelse. Resultater fra Xpert Breast Cancer STRAT4 skal tolkes sammen med andre laboratoriedata og kliniske data som er tilgjengelig for klinikeren.
- Ytelsen til Xpert Breast Cancer STRAT4 ble validert med prosedyrene i denne bruksanvisningen og med FFPE-prøver som var fem til ti år gamle.
- Ytelsen til Xpert Breast Cancer STRAT4 er kun validert med prosedyrene oppgitt i denne bruksanvisningen.
- Feilaktige prøveresultater kan oppstå fra feil prøvetaking, feil håndtering eller oppbevaring av prøver eller forveksling av prøver. Instruksjonene i denne bruksanvisningen må følges nøye for å unngå feilaktige resultater.
- Ytelseegenskaper ble ikke etablert for pasienter yngre enn 25 år.
- Mutasjoner eller polymorfismer i primer- og probebindingsregioner kan føre til feilaktige, men troverdige resultater for *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* og *MKi67*.

18 Ytelseegenskaper

18.1 Klinisk ytelse

Ytelseegenskapene til Xpert Breast Cancer STRAT4-testen ble evaluert i forhold til IHC-resultater for ER, PR, HER2 og Ki67 og i forhold til fluorescens in situ-hybridisering (FISH) for amplifikasjon av HER2-genet på steder i USA og EU. Opprinnelig ble totalt 211 aidentifiserte rest-FFPE-prøver av primære invasive brystkrefttumorer fra USA og EU innlemmet i denne studien. 10 prøver ble ekskludert fordi det ikke var nok tumor tilgjengelig for testing, og én prøve ble ekskludert på grunn av tilbaketrukket samtykke. Dermed var totalt 200 prøver tilgjengelig for å inkluderes i dataanalysene. For hver FFPE-prøve ble det klargjort flere snitt for testing med Xpert; for IHC-testing av ER, PR, HER2 og Ki67; og for FISH-testing av amplifikasjon av HER2-genet.

Totalt ga Xpert Breast Cancer STRAT4 gyldige resultater på første testforsøk for 99,5 % (199/200) av studieprøvene. Én prøve som først ga et ubestemmelig resultat (**FEIL (ERROR)**, **UGYLDIG (INVALID)** eller **INTET RESULTAT (NO RESULT)**), ga et testresultat etter en enkelt ny test. Den samlede andelen av vellykket analyse var 100,0 % (200/200).

Av de 200 prøvene med gyldige Xpert testresultater ga ESR1 og ERBB2 et gyldig positivt eller negativt testresultat 100 % av tiden (200/200). For PGR og MKi67 ga Xpert et gyldig positivt eller negativt testresultat i henholdsvis 98,5 % (197/200) og 97,0 % (194/200) av tilfellene. De 7 prøvene med Xpert ubestemmelig resultater for PGR og/eller MKi67 ble testet på nytt med metoden med konsentrert FFPE-lysat. Resultatene fra både den opprinnelige testen (første forsøk) og den nye testen vises i Tabell 3.

For hele datasettet, inkludert resultatene fra ny test, viste Xpert Breast Cancer STRAT4 et positivt samsvar i prosent (PPA) på 97,2 %, et negativt samsvar i prosent (NPA) på 95,0 % og et totalt samsvar i prosent (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 IHC;¹⁹ 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-terskelen satt til > 20 % for positiv og < 10 % for negativ. MKi67 IHC ubestemmelig prøver (10–20 % terskel, inklusive) ble ekskludert fra analysen. Samlet PPA, NPA og OPA for hvert mål vises i Tabell 3.

Tabell 3. Klinisk ytelse

Sammenligning	Datsett ^a	Totalt (n) ^b	PPA	95% CI	NPA	95% CI	OPA	95% CI
ESR1/ER Xpert kontra IHC	Opprinnelig	199	97,2 % (174/179)	93,6–98,8	100 % (20/20)	83,9–100	97,5 % (194/199)	94,3–98,9
	Test som tas på nytt	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 kontra IHC	Opprinnelig	196	89,0 % (137/154)	83,0–93,0	92,9 % (39/42)	81,0–97,5	89,8 % (176/196)	84,8–93,3
	Test som tas på nytt	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 kontra IHC	Opprinnelig	180	100 % (22/22)	85,1–100	92,4 % (146/158)	87,2–95,6	93,3 % (168/180)	88,7–96,1
	Test som tas på nytt	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 kontra FISH	Opprinnelig	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1
	Test som tas på nytt	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 kontra IHC + FISH	Opprinnelig	197	100 % (27/27)	87,5–100	91,2 % (155/170)	86,0–94,6	92,4 % (182/197)	87,8–95,3
	Test som tas på nytt	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 kontra IHC	Opprinnelig	148	88,7 % (110/124)	81,9–93,2	100 % (24/24)	86,2–100	90,5 % (134/148)	84,7–94,3
	Test som tas på nytt	151	88,8 % (111/125)	82,1–93,2	100 % (26/26)	87,1–100	90,7 % (137/151)	85,0–94,4

^a Opprinnelig = 1X lysat i henhold til instruksjonene i bruksanvisningen; Ny test = resultat fra ny test med et 4X konsentrert lysat i tilfeller hvor den opprinnelige prøven (1X lysat) ga et ubestemmelig resultat for PGR og/eller MKi67.

^b Prøver med ubestemmelige Xpert-resultater, prøver med tvetydige eller ubestemmelige IHC-resultater, prøver med mislykket IHC og mislykket FISH er ekskludert.

19 Analytisk ytelse

19.1 Analytisk sensitivitet / minimum analyseinnngang

Minimum analyseinnngang ble bestemt ved å vurdere maksimal CYFIP1 Ct (referansegen) som nøyaktig bestemmer prøveinngangen som behøves for robust analyseytelse. Denne prøveinngangen sikrer at gyldige resultater oppnås i de fleste kliniske FFPE-prøvene som testes. Prøver med en CYFIP1 Ct-verdi større enn den som er tillatt, vil generere et **UGYLDIG (INVALID)** resultat.

Den analytiske sensitiviteten / minimum analyseinngangen for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen, definert som maksimum CYFIP1 Ct som gir $\geq 95\%$ gyldige resultater, ble etablert med forfynninger av FFPE klinisk prøve-lysater for å utfordre CYFIP1 Ct. For å vurdere sensitiviteten til CYFIP1 Ct ble FFPE klinisk prøve-lysater serielt forfynnet og testet med $n = 20$ replikater per forfynningsnivå over 3 dager til $\leq 95\%$ av testresultatene var gyldige. Forfynningsnivåene inkluderte én prøve ved den forventede minimum analyseinngangen, to nivåer under det og to nivåer over. Testingen ble utført på to partier med Xpert Breast Cancer STRAT4-patroner.

Før igangsetting av studien ble det utført blankverdigrensetesting med $n = 60$ replikater med to uavhengige partier med Xpert Breast Cancer STRAT4-patroner. Blankverdigrenseprøven besto av et blankt parafinsnitt (ingen vevsprøve), og alle testresultatene viste forventede UGYLDIG (**UGYLDIG (INVALID)**) resultater. Serielle forfynninger av den kliniske FFPE vevsprøveinngangen ved 1/1000 ga 20/20 gyldige CYFIP1 Ct-er med gjennomsnittlig Ct = 33,4 og 0,6 SD fra parti 1 med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen og gjennomsnittlig Ct = 33,6 og 0,5 SD fra parti 2. Videre forfynninger med

senere CYFIP1 Ct-verdier oppfylte ikke ≥ 95 % gyldige resultater som krevdes for studien. Tabell 4 oppsummerer antall gyldige testkjøringer ved hvert serielt fortennede prøveinngangsnivå som relativ fortykning eller som gjennomsnittlig CYFIP1 Ct. Den analytiske sensitiviteten med to partier med Xpert Breast Cancer STRAT4-testpatroner viste minimum analyseinngangskrav for CYFIP1 Ct = 33,4. Denne verdien, kombinert med analysevariasjon, ville tillate at den øvre grensen CYFIP1 Ct = 35 settes for Xpert Breast Cancer STRAT4-testen.

Tabell 4. Minimum analyseinngang i Xpert Breast Cancer STRAT4

Settparti	Prøveinngang (relativ fortykning)	Gjennomsnittlig CYFIP1 Ct	SD	N gyldig kjøring (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
	NTC	I/A	I/A	0/20
00903 (parti 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	I/A	I/A	0/20

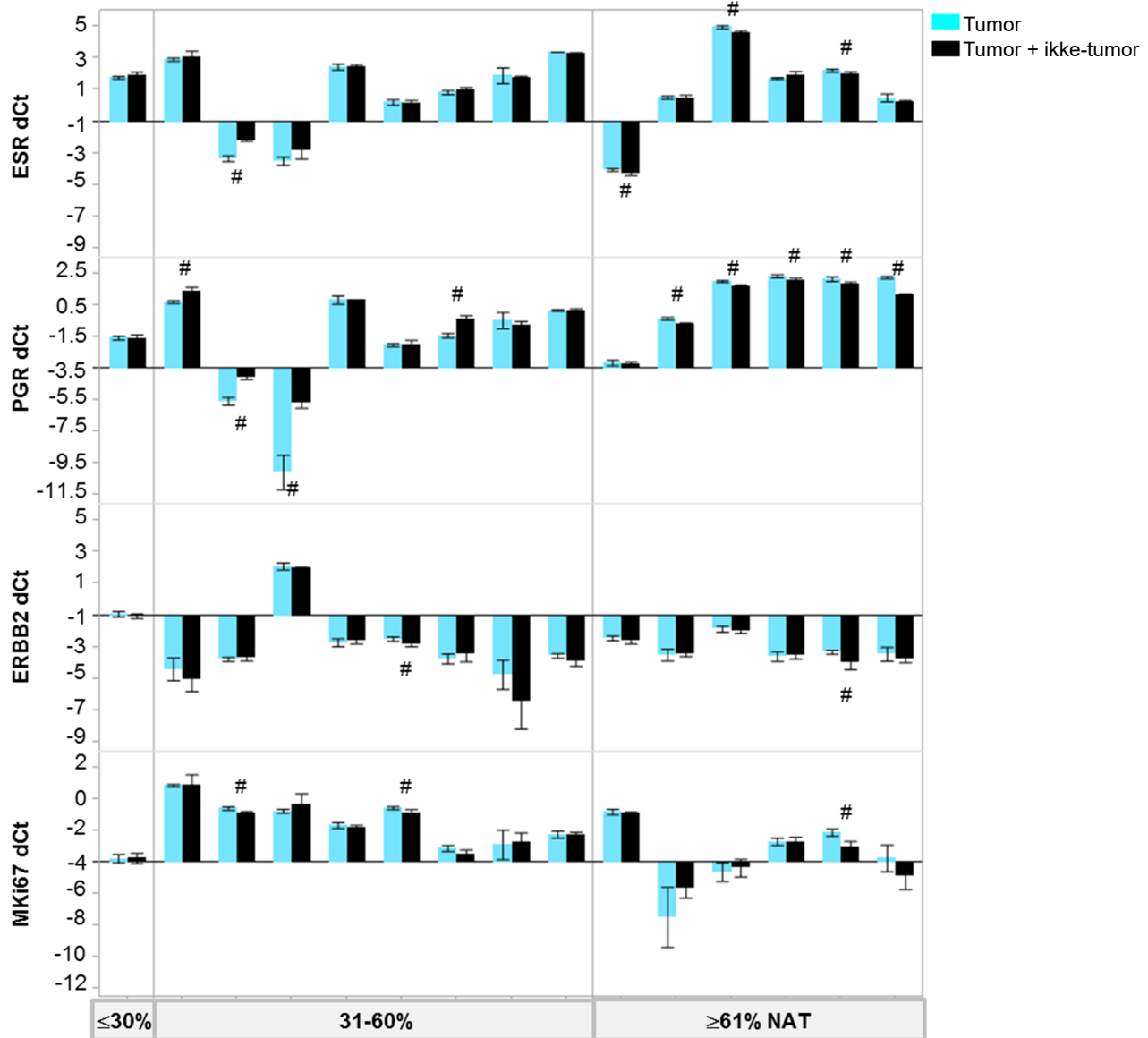
19.2 Interferenstesting

Tilstøtende normalt/ikke-tumor vev

Normalt tilstøtende (ikke-tumor) vev (NAT) er ofte til stede blant brystkreftvevsprøver som kontaminanter som potensielt interfererer med deteksjon av bestemt mål. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen kan kreve at et FFPE-snitt av en patologisk verifisert brysttumor makrodissekteres for å minimere potensielle effekter av ikke-tumor-kontaminanter i relevante tilfeller som bestemt av en patolog. For å vurdere effekten av tilstøtende normale/ikke-tumor vev ble femten (15) FFPE-vevblokker med invasiv brystkarsinom som inneholdt 21–98 % omkringliggende NAT, testet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen med og uten makrodisseksjon. Xpert Breast Cancer STRAT4-testing ble utført med $n = 4$ replikater fra samme lysat per betingelse. ESR1, PGR, ERBB2 og MKi67 dCt-er for hver vevsprøve med makrodisseksjon (stolpediagram i blått) eller uten makrodisseksjon (stolpediagram i svart) ble først evaluert via enveis ANOVA for å bestemme statistisk interferens fra NAT. Klinisk signifikant interferens fra NAT ble ansett å være til stede når ddCt (delta-delta Ct) mellom prøver med og uten makrodisseksjon var $> 1,0$ og det var en endring i testresultatet. Studieresultatene er oppsummert i Figur 6.

ESR1, PGR, ERBB2 og MKi67 dCt-er for alle de 15 prøvene ble gruppert basert på % NAT (≤ 30 %, 31–60 % eller ≥ 61 %). Blå og svarte loddrette stolpediagrammer med SD representerer gjennomsnittlige mål-dCT-er fra $n = 4$ replikater av FFPE-snitt med og uten makrodisseksjon av en FFPE invasiv brystkreft-blokk. Alle de 15 FFPE-blokkene ($n = 1$ under 30 % NAT, $n = 8$ med 31–60 % NAT og $n = 6$ over 60 % NAT) viste enten ingen statistisk signifikans av interferensen fra tilstøtende normalt/ikke-tumor vev basert på enveis ANOVA-analyser med p -verdi $\geq 0,05$; eller ingen klinisk signifikans (markert som #) hvis variasjonen i delta Ct-verdier for hvert mål mellom prøver med og uten makrodisseksjon var $\leq 1,0$, eller når målttestresultatene (positive, negative) forble upåvirket.

Figur 6. Interferens fra tilstøtende normalt/ikke-tumor vev med Xpert Breast Cancer STRAT4 mål-dCt-er



DCIS, nekrotisk, hemoragisk vev

For å vurdere effekten av ductalt carcinoma in situ (DCIS), nekrotiske og hemoragiske vev ble totalt 9 FFPE brysttumorprøver (3 FFPE brysttumorblokker som inneholdt 3–61 % DCIS, 3 FFPE-blokker som inneholdt 10–65 % nekrotisk vev, og 3 FFPE-blokker som inneholdt 15–41 % hemoragisk vev) testet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen med og uten makrodisseksjon. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen ble utført med $n = 4$ replikater fra samme lysat per betingelse. Alle testbetingelsene ble funnet å ha enten ingen statistisk eller ingen klinisk signifikant påvirkning fra varierende kontaminasjoner av DCIS, nekrotisk og hemoragisk vev med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen (grafiske data ikke vist).

Humant genomisk DNA (hgDNA)

Xpert Breast Cancer STRAT4-testen bruker svært spesifikke primere og prober til effektivt å hybridisere med mål-mRNA-templatene for ESR1, PGR, ERBB2 og MKi67 fra en pool med genomiske nukleinsyrer (humant genomisk DNA = hgDNA). For å vurdere effekten av hgDNA på Xpert Breast Cancer STRAT4-testen ble 10 FFPE brysttumorblokker med varierende innhold av invasiv ductalt carcinoma-celler makrodissekert og testet med og uten tilsetning av 25 ng hgDNA i FFPE-prøvelysatene med Xpert Breast Cancer STRAT4-testen i $n = 4$ replikater fra samme lysat per betingelse. Alle testbetingelsene ble funnet å ha enten ingen statistisk eller ingen klinisk signifikant påvirkning fra hgDNA-interferensen (grafiske data ikke vist).

19.3 «Carry-over»-kontaminasjon

Det ble utført en studie for å demonstrere at selvstendige GeneXpert-patroner til engangsbruk minimerer «carry-over»-kontaminasjon fra svært høye positive prøver i etterfølgende negative prøver kjørt i samme GeneXpert-modul. Studien besto av en negativ prøve prosessert i samme GeneXpert-modul umiddelbart etter en høy ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 positiv prøve. Den negative prøven besto av in vitro-transkribert (IVT) RNA som inneholdt CYFIP1-transkript ved 5×10^4 kopier for å sikre tilstedeværelse av et referansegemål. Den høye positive prøven besto av IVT-RNA som inneholdt CYFIP1-transkript ved 5×10^5 kopier, og IVT-RNA som inneholdt ESR1-, PGR-, ERBB2- og MKi67-transkripter ved 5×10^6 kopier, klargjort som FFPE-lysat. Testordningen ble gjentatt 41 ganger med en enkelt GeneXpert-modul for totalt 20 høye positive og 21 negative prøver. Alle de 20 høye positive prøvene ble riktig rapportert som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIV (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVE), og alle de 21 negative prøvene ble riktig rapportert som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIV (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVE).

19.4 Analysens reproduserbarhet og presisjon

Reproduserbarheten til Xpert Breast Cancer STRAT4 ble evaluert med et panel på fem lysatprøver.

Tre panelmedlemmer ble klargjort ved å tilsette in vitro-transkript (IVT) RNA i FFPE lysesbuffer tilsatt innenfor ~ 2 dCt-er av dCt-avskjæringene for ESR1 (1 IVT RNA), PGR (2 IVT RNA) og ERBB2 (3 IVT RNA), og med CYFIP1 Ct-verdier $\sim 2-3$ Ct-er fra minimum analyseinnngangs nivået.

To panelmedlemmer (4 klinisk FFPE-prøve og 5 klinisk FFPE-prøve) ble opprettet fra poolede kliniske FFPE-prøver i FFPE-lysesbuffer for å generere CYFIP1 Ct-verdier i nærheten av minimum analyseinngang og for å ha dCt avskjæringsverdier for alle målene over det rapporterbare området og, i den grad det var mulig, i nærheten av dCt-avskjæringene.

To operatører ved hvert av de tre studiestedene testet to paneler med fem prøver per dag over seks testdager (fem prøver \times seks dager \times to operatører \times to replikater \times tre steder). Totalt 72 replikater per prøve ble testet. Tre partier med Xpert Breast Cancer STRAT4-patroner ble brukt på hvert av de tre teststedene. Xpert Breast Cancer STRAT4-testen ble utført i henhold til prosedyren i denne bruksanvisningen.

Reproduserbarheten til Xpert Breast Cancer STRAT4 ble evaluert i form av dCt for hvert av de fire målene for hvert panel. Gjennomsnittet, standardavviket (SD) og variasjonskoeffisienten (CV) mellom steder, mellom partier, mellom dager, mellom operatører og innen analysen for hvert panelmedlem presenteres i Tabell 5.

Tabell 5. Sammendrag av reproduserbarhetsdata

Prøve	Analysekanal (analytt)	N ^a	Gjennomsnittlig dCt	Mellom steder		Mellom partier		Mellom dager		Mellom operatører		Innen analysen		Totalt	
				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 (analytt)	N ^a	Gjennomsnittlig dCt	Mellom steder		Mellom partier		Mellom dager		Mellom operatører		Innen analysen		Totalt	
				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-verdier av 72

20 Referanser

- American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) og 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>.
- American Cancer Society, Breast Cancer Facts and Figures 2013-2014, Atlanta, GA: American Cancer Society, 2013.
- 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.
- Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuschler 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.
- Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1991;9:1283–1297.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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 Cepheids hovedkontorer

Konsernhovedkontor

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Europeisk hovedkontor

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Teknisk assistanse

Innhent følgende informasjon før du kontakter Cepheids tekniske brukerstøtte:

- Produktnavn
- Partinummer
- Instrumentets serienummer
- Feilmeldinger (om det er noen)
- Programversjon og, hvis relevant, nummeret på datamaskinens serviceetikett

USA




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















Frankrike

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

Kontaktinformasjon for alle Cepheids kontorer for teknisk brukerstøtte finnes på nettstedet vårt: www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Symboltabell

Symbol	Betydning
	Katalognummer
	<i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr
	CE-merking – europeisk samsvar

Symbol	Betydning
	Autorisert representant i EU
	Må ikke gjenbrukes
	Partikode
	Se bruksanvisningen
	Forsiktig
	Produsent
	Produksjonsland
	Inneholder nok til n tester
	Kontroll
	Utløpsdato
	Temperaturbegrensning
	Biologiske risikoer
	Autorisert representant i Sveits
	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 Revisjonshistorikk

Avsnitt	Beskrivelse av endring
Symboltabell	Lagt til symboler og definisjoner for CH REP og importør i symbolforklaringen. Lagt til informasjon med adresse i Sveits for CH REP og importør.
Revisjonshistorikk	Oppdatert revisjonshistorikktabell.