

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Uputstvo za upotrebu

IVD CE

Obaveštenja o zaštitnim znakovima, patentima i autorskom pravu

Cepheid[®], Cepheid logotip, GeneXpert[®] i Xpert[®] su zaštitni znakovi kompanije Cepheid, registrovani u SAD-u i drugim zemljama.

Svi ostali zaštitni znakovi su vlasništvo njihovih vlasnika.

KUPOVINA OVOG PROIZVODA PRENOSI KUPCU NEPRENOSIVO PRAVO DA GA KORISTI U SKLADU SA OVIM UPUTSTVOM ZA UPOTREBU. NIKAKVA DRUGA PRAVA SE NE PRENOSE IZRIČITO, IMPLIKACIJOM ILI ZABRANOM. ŠTAVIŠE, NIKAKVA PRAVA NA DALJU PRODAJU SE NE DOBIJAJU KUPOVINOM OVOG PROIZVODA.

© 2017-2023 Cepheid.

Pogledajte Istoriju revizija za opis promena.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Medicinsko sredstvo za *in vitro* dijagnostiku

1 Vlasničko ime

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Opšte prihvaćeni ili uobičajeni naziv

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Namena

Xpert Breast Cancer STRAT4 test je polukvantitativna analiza zasnovana na lančanoj reakciji polimeraze sa kvalitativnim vrednostima preseka za estrogenski receptor (*ESR1*), progesteronski receptor (*PGR*), receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta (*ERBB2/HER2*) i marker proliferacije Ki-67 (*MKi67*) mRNK, izolovanih iz tkiva sa invazivnim karcinomom dojke, koje je fiksirano formalinom i impregnirano parafinom. RNK se ekstrahuje iz oblasti bogate tumorom, iz mikroskopskog isečka tkiva, koji je identifikovao patolog. Test treba koristiti u kombinaciji sa drugim kliničkim i laboratorijskim podacima kako bi se klasifikovala tkiva karcinoma dojke u pogledu statusa hormonskih receptora, statusa HER2 receptora i statusa markera proliferacije. Test je namenjen za korišćenje sa GeneXpert[®] sistemom, što obuhvata izolaciju RNK iz FFPE tkiva, kao i amplifikaciju i detekciju ciljanih sekvenci u okviru patrone.

Xpert Breast Cancer STRAT4 test nije namenjen za:

- Predviđanje težine bolesti
- Samostalno dijagnostičko testiranje za karcinom dojke
- Prognozu recidiva bolesti

Indikacije za upotrebu: Test je namenjen za procenu nivoa mRNK *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67* u tkivima sa invazivnim karcinomom dojke dobijenih od pacijenata i pripremljenih kao FFPE uzorci, i kao pomoćno sredstvo u kliničkoj proceni, zajedno sa drugim laboratorijskim podacima.

4 Sažetak i objašnjenje

Karcinom dojke je jedan od najčešćih karcinoma kod žena širom sveta, sa približno 1,7 miliona novih slučajeva karcinoma dojke svake godine.¹ U Evropi, približno 494.000 novih slučajeva se dijagnostikuje svake godine, a 143.000 pacijenata će umreti zbog ove bolesti. U SAD-u, dijagnostikovano je približno 200.000 novih slučajeva invazivnog karcinoma dojke 2015.² Karcinom dojke je najčešći uzročnik mortaliteta usled karcinoma među ženama u zemljama u razvoju, a drugi najčešći uzročnik mortaliteta usled karcinoma (nakon karcinoma pluća) među ženama u razvijenim zemljama.²

Kod žena, karcinom dojke je najčešće dijagnostikovani karcinom i glavni uzročnik smrti usled karcinoma.¹ Mortalitet usled karcinoma dojke je smanjen za 34 procenata od 1990. godine, najviše zbog poboljšanog lečenja i ranog otkrivanja.³ Merenja ekspresije proteina ER i PR su prognostička za ishode karcinoma dojke i predviđaju odgovor na tamoksifen i druge hormonske terapije.^{4,5,6,7} HER2 prekomerna ekspresija nosi negativnu prognozu kod žena sa karcinomom dojke; ali što je još važnije, odgovor na trastuzumab i druge HER2 ciljane terapije, predviđa se prekomernom ekspresijom HER2 (*ERBB2*) proteina ili amplifikacijom HER2 gena.⁸ Marker proliferacije Ki-67 (*MKi67*) je dosta ispitivan u retrospektivnim studijama koje su uključivale pacijente sa karcinomom dojke⁹ i smatra se važnim pokazateljom potrebe za hemioterapijom.¹⁰ Meta analize su demonstrirale da je povezan sa lošijim ishodima preživljavanja kod ranog karcinoma dojke.¹¹ S obzirom na

važnost ovih markera pri odabiru efikasnog režima lečenja za pacijente sa karcinomom dojke, smernice Evropskog udruženja za medicinsku onkologiju (ESMO) preporučuju da se svi primarni karcinomi dojke testiraju na ER, PR, HER2 (ERBB2) i Ki67 u vreme dijagnoze.¹²

Imunohistohemija (IHC) se uobičajeno koristi za merenje ekspresije proteina ER, PR, HER2 i Ki67. Za HER2 ekspresiju, IHC je tipično prvi test koji se izvodi, a rezultati se ocenjuju na skali od 0 do 3+. Ako je rezultat ekvivokalan za HER2 ekspresiju (2+), uzorak se reflektuje na HER2 in situ analizu hibridizacije (ISH), kao što su fluorescencija in situ hibridizacije (FISH), ili hromogena in situ hibridizacija (CISH) koja pretražuje amplifikaciju HER2 gena.¹³ Visok stepen varijabilnosti u rezultatima je pokazan za IHC i ISH kada se poredi širom laboratorija, najviše zbog razlika u antitelima koja se koriste za IHC, kao i zbog subjektivnosti metoda tumačenja.¹⁴

Xpert Breast Cancer STRAT4 test je in vitro dijagnostički test koji se koristi za određivanje nivoa ekspresije mRNK za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67* izolovanih iz FFPE uzoraka tkiva kod invazivnog karcinoma dojke.

Analiza se izvodi u samostalnoj patroni nakon kratkog koraka pripreme lizata uzorka van instrumenta, za šta je potrebno manje od 15 minuta uz ukupno vreme koje je manje od 2 sata.

5 Princip postupka

Xpert Breast Cancer STRAT4 test je analiza lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (PCR) za detekciju *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67* mRNA izolovanih iz tkiva invazivnog tumora dojke, koje je fiksirano formalinom i impregnirano u parafinu (FFPE). Analiza je obavljena na Cepheid GeneXpert sistemima instrumenata. GeneXpert sistemi instrumenata automatizuju i integrišu prečišćavanje uzoraka, amplifikaciju nukleinske kiseline i detekciju ciljane sekvence u jednostavnim ili složenim uzorcima pomoću RT-PCR u realnom vremenu. Sistemi se sastoje od instrumenta, bar-kod skenera, računara i unapred učitano softvera za izvođenje testova i pregled rezultata. Sistemi zahtevaju upotrebu GeneXpert patrona za jednokratnu upotrebu koji sadrže RT-PCR reagense i koji su domaćini RT-PCR procesa. Za puni opis sistema, pogledajte odgovarajući priručnik za operatera za GeneXpert sistem instrumenata.

Xpert Breast Cancer STRAT4 test uključuje reagense za simultanu detekciju *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, citoplazmatski *FMR1* interaktivni protein 1 (*CYFIP1*) referentni gen, unutrašnju RT-PCR kontrolu (*CIC*) i unutrašnju kontrolu provere probe (*PCC*). Referentni gen potvrđuje adekvatnost uzorka i koristi se za normalizaciju nivoa ekspresije mRNA za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67*. Unutrašnja RT-PCR kontrola (*CIC*) se koristi za proveru pravilne obrade RT-PCR reakcije. *PCC* proverava rehidrataciju zrna reagensa, punjenje RT-PCR epruvete, integritet probe i stabilnost boje u patroni. Ukupno, analiza koristi šest različitih fluorescentnih kanala za detekciju cilja ili kontrole/reference sa sopstvenim parametrima preseka za potvrdu cilja/kontrole/reference.

FFPE uzorci najpre moraju biti tretirani Xpert® FFPE kompletom za lizu, pripremom (mikronskog)-isečka tkiva debljine 4-5 µm, gde je FFPE tkivo najpre makrodisektovano ako je potrebno, kako bi oblast tkiva bila bogata invazivnim tumorom, a zatim ostrugani i postavljeni u epruvetu zajedno sa preporučenim zapreminama FFPE reagensa za lizu i proteinaze K. Rastvor se zatim inkubira u bloku za toplotu na temperaturi od 80°C 30 minuta. Nakon toga uzorak se meša sa etanolom, pa se onda direktno u test patronu dodaje preporučena zapremina pripremljenog lizata uzorka. Patrona za testiranje se postavlja u modul GeneXpert sistema instrumenata, gde su prečišćavanje nukleinskih kiselina, amplifikacija i detekcija u realnom vremenu u potpunosti automatizovane i integrisane od strane sistema. Svi reagensi potrebni za pripremu uzorka na instrumentu i RT-PCR analizu, prethodno su učitani u patroni. Nukleinske kiseline u lizatu se hvataju na filteru, peru se i eluiraju sonifikacijom. Prečišćena nukleinska kiselina se meša sa RT-PCR reagensima, a rastvor se prenosi u reakcionu epruvetu za RT-PCR i detekciju. Vreme do rezultata iznosi približno 75 minuta za GeneXpert.

Detekcija preseka koje Xpert Breast Cancer STRAT4 test koristi u svakom fluorescentnom kanalu, utvrđena je kako bi se pozitivan, negativan i sveukupan procenat slaganja doveo do maksimuma, u poređenju sa referentnim laboratorijskim IHC ili IHC/FISH rezultatima za svaki cilj. IHC za ER, PR, Ki67 i HER2, kao i za FISH za HER2, obrađene su i ocenjene prema uputstvima u uputstvu za upotrebu. Tumačenje pozitivnih rezultata dovršeno je prema ASCO/CAP 2013 smernicama.¹⁵ Tumori su klasifikovani kao ER ili PRIHC pozitivni kad je $\geq 1\%$ ćelija invazivnog tumora pokazalo definitivno bojenje nukleusa, bez obzira na intenzitet bojenja. HER2 ekspresija procenjena je pomoću HercepTest (IHC) kompleta (Dako) i ocenjena je kao 0, 1+, 2+ ili 3+. Tumori ocenjeni kao 2+ bili su reflektovani na HER2 FISH pomoću PathVysion HER2 DNK kompleta probe (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Slučajevi su smatrani da su HER2 pozitivni ako su ocenjeni kao 3+ pomoću IHC i/ili pomoću amplifikacije FISH (definisano kao HER2:CEP17 (odnos $\geq 2,0$) i/ili prosečan broj HER2 kopija $\geq 6,0$ signala/ćelija u skladu sa 2013 ASCO/CAP Ažuriranim smernicama kliničke prakse za HER2 testiranje kod karcinoma dojke.¹⁵ Za Ki67, tumori su klasifikovani kao pozitivni (visoko) kad je $\geq 20\%$ invazivnih tumorskih ćelija pokazalo definitivno bojenje nukleusa, bez obzira na intenzitet bojenja.

U slučaju kontrole referentnog gena i unutrašnje RT-PCR kontrole, detekcija preseka definiše opsege minimalnih i maksimalnih PCR vrednosti praga ciklusa (Ct), koje određuju važeći rezultat, minimalni adekvatni unos uzorka i da nema PCR inhibicije. U slučaju ESR1, PGR, ERBB2 i MKi67 ciljeva, detekcija preseka je definisana vrednostima praga delta ciklusa (dCt) (Ct referentnog gena minus Ct ciljanog gena), koje određuju POZITIVNE naspram NEGATIVNIH rezultata za dati cilj u kanalu.

6 Reagensi i instrumenti

6.1 Priloženi materijal

Xpert Breast Cancer STRAT4 komplet sadrži dovoljno reagenasa za obradu 10 uzoraka kontrole kvaliteta ili FFPE lizata, pripremljenih pomoću kompleta Xpert FFPE Lysis Kit (kataloški br. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Xpert Breast Cancer STRAT4 komplet sadrži sledeće stavke:

Xpert Breast Cancer STRAT4 patrone sa integrisanim reakcionim epruветama	10
<ul style="list-style-type: none"> • Zrno 1, 2 i 3 (zamrznuto-osušeno) • Reagens za ispiranje, • Reagens za eluciju, 	<ul style="list-style-type: none"> 1 po patroni 1,0 ml po patroni 2,0 ml po patroni
CD	1 po kompletu
<ul style="list-style-type: none"> • Datoteka za definiciju testa (ADF) • Uputstvo za upotrebu • ONCore datoteke izveštaja 	

Напомена Listovi sa bezbednosnim podacima (SDS), dostupni su na www.cepheid.com ili www.cepheidinternational.com na kartici **PODRŠKA (SUPPORT)**.

Напомена Goveđi serumski albumin (BSA) u zrnima ovog proizvoda napravljen je i proizveden isključivo od goveđe plazme poreklom iz Sjedinjenih Država. Životinjama nije davan nijedan protein preživara ili drugi proteini životinjskog porekla; životinje su prošle ante- i post-mortem testiranje. Tokom obrade nije bilo mešanja materijala sa drugim životinjskim materijalima.

7 Skladištenje i rukovanje

- Skladištite Xpert Breast Cancer STRAT4 komplet na temperaturi od 2–28°C.
- Nemojte otvarati poklopac patrone dok niste spremni za testiranje.
- Iskoristite patronu u roku od 30 minuta nakon otvaranja poklopca.
- Nemojte koristiti patronu koja je procurela.

8 Materijali koji su potrebni, ali nisu obezbeđeni

- Xpert FFPE komplet za lizu (kataloški br. GXFFPE-LYSIS-CE-10) za pripremu FFPE lizata. Ovaj komplet sadrži FFPE reagens za lizu, proteinazu K (PK), epruvete od 1,5 ml i bočice od 5 ml.
- Vorteks mešalica.
- Pipete i vrhovi pipeta sa filterima za aerosoli pogodne za pipetiranje 600 µl, 1,2 µl i 520 µl.
- Računar sa vlasničkim GeneXpert softverom verzije 4.7b ili novijom ili Xpertise verziju 6.4b ili noviju, skener bar-koda i odgovarajuće uputstvo za operatere za GeneXpert sistem instrumenata.
- Štampač: Ako je štampač neophodan, kontaktirajte Cepheid tehničku podršku da dogovorite kupovinu preporučenog štampača.

9 Upozorenja i mere predostrožnosti

- Samo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Svim biološkim uzorcima treba rukovati kao da su sposobni za prenos infektivnih agenasa. Svim humanim uzorcima treba rukovati uz standardne mere predostrožnosti. Smernice za rukovanje uzorcima dostupne su od strane Svetske zdravstvene organizacije ili od strane SAD Centara za kontrolu i prevenciju bolesti.
- Pridržavajte se sigurnosnih procedura vaše ustanove za rad sa hemikalijama i rukovanje biološkim uzorcima.
- Karakteristike performansi ovog testa utvrđene su tipovima uzoraka navedenim u Odeljak 3. Performanse ove analize sa drugim tipovima uzoraka ili uzorcima nisu procenjene.
- FFPE tkivo mora biti obrađeno pomoću Xpert FFPE kompleta za lizu (kataloški br. GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Nekompletno uklanjanje (guljenje) oblasti tumora sa pločice za pripremu FFPE lizata može dovesti do nedovoljno materijala za analizu, a samim tim i do veće stope neodređenosti/nevaženja od očekivane kad se koristi Xpert Breast Cancer STRAT4 test.
- Nemojte otvarati Xpert Breast Cancer STRAT4 poklopac patrone osim kada dodajete pripremljeni FFPE lizat.
- Nemojte koristiti patronu koja je pala nakon što ste je izvadili iz pakovanja.
- Nemojte protresati patronu. Protresanje ili ispuštanje patrone nakon otvaranja poklopca patrone može dovesti do nevažućih rezultata.
- Nemojte koristiti patronu čija je reakciona epruveta oštećena.
- Svaka jednokratna patrona Xpert Breast Cancer STRAT4 testa koristi se za obradu jednog testa. Nemojte ponovo koristiti iskorišćene patrone.
- Ne koristite patronu ako se čini da je mokra ili ako se čini da je zaptivka poklopca polomljena.
- Nemojte postavljati nalepnicu za ID uzorka na poklopac patrone ili na nalepnicu sa bar-kodom.
- Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući menjanje rukavica između rukovanja uzorcima pacijenata, kako bi se izbegla kontaminacija uzoraka ili reagenasa.
- Sledite uputstva osoblja vaše ustanove za pravilno odlaganje iskorišćenih patrona i neiskorišćenih reagenasa u otpad. Proverite državne, teritorijalne ili lokalne propise jer se mogu razlikovati od saveznih propisa za odlaganje otpada. Materijal može pokazivati karakteristike hemijskog opasnog otpada i zahteva posebno odlaganje. Ustanove treba da provere njihove odredbe u vezi sa odlaganjem opasnog otpada.

10 Opasnosti od hemikalija^{16,17}

U skladu sa Globalnim harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje (Globally Harmonized System for Classification and Labeling, GHS), ovaj proizvod se ne smatra opasnim.

11 Prikupljanje uzorka, transport i skladištenje

- Koristite samo FFPE uzorke obrađene pomoću kompleta Xpert FFPE Lysis Kit (kataloški br. GXFFPE-LYSIS-CE-10). Pratite ASCO/CAP smernice¹⁵ za pripremu FFPE tkiva.
- FFPE lizat treba pripremiti iz FFPE bloka tumora iz najveće oblasti vijabilnog karcinoma dojke (minimalno 30% tumorske celularnosti), a ručnu makrodisekciju treba izvesti, ako je potrebno, pre testiranja pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa. Za uzorke tumora manje od 10 mm² sa manje od 30% tumora, koristite postupak za koncentrovani lizat, ili može biti potrebno više od jednog isečka debljine 4-5 µm za važeće rezultate.
- FFPE lizat treba transportovati u laboratoriju na temperaturi od 2–8°C.
- FFPE lizat je stabilan do nedelju dana na temperaturi od 2–8°C, ili 4 nedelje na temperaturi ≤ -20°C pre testiranja pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa. Za dugotrajno skladištenje, skladištite na temperaturi od -80°C. Ne preporučuje se više od jednog zamrzavanja-odmrzavanja. Prilikom odmrzavanja, odmrzavajte na sobnoj temperaturi i promešajte FFPE lizat pomoću vorteks mešalice 15 sekundi pre upotrebe.

12 Postupak

Важно Upotreba Xpert Breast Cancer STRAT4 patrona zahteva pripremu lizata pomoću Xpert FFPE kompleta za lizu (kataloški br. GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Важно Započnite analizu u roku od 30 minuta od dodavanja pripremljenog uzorka u patronu.

12.1 Priprema FFPE lizata

Pripremite FFPE lizat prema uputstvima za upotrebu FFPE kompleta za lizu.

12.2 Priprema patrone

1. Izvadite patronu iz kartonskog pakovanja.
2. U vorteks mešalici pripremite FFPE lizat 15 sekundi pre upotrebe.
3. Otvorite poklopac patrone.
4. Pomoću pipete, prebacite 520 µl FFPE lizata u komoru za uzorke patrone. (Napomena: može biti prisutna mala količina precipitata, što ne utiče na performanse analize).

Preostali FFPE lizat čuvajte na temperaturi od 2–8°C ili ≤–20°C u slučaju ponavljanja testa.



Slika 1. Xpert Breast Cancer STRAT4 patrona (pogled odozgo)

5. Zatvorite poklopac patrone. Uverite se da je poklopac čvrsto ulegao na mesto.

12.3 Započinjanje testa

Важно Pre nego što započnete test, uverite se da je u softver uvezena odgovarajuća Xpert Breast Cancer STRAT4 datoteka za definiciju testa (ADF).

Ovaj odeljak navodi podrazumevane korake za rukovanje GeneXpert sistemom. Za detaljna uputstva, pogledajte *GeneXpert Dx sistem priručnik za operatera* ili *GeneXpert Infinity sistem priručnik za operatera*, u zavisnosti od modela instrumenta koji se koristi.

Напомена Koraci koje pratite mogu se razlikovati ako je administrator sistema promenio podrazumevani tok rada sistema.

1. Uključite GeneXpert instrument:
 - Ako koristite GeneXpert Dx instrument, prvo uključite GeneXpert Dx instrument, a zatim uključite računar. GeneXpert softver će se automatski pokrenuti ili će možda biti potrebno dvaput kliknuti na ikonu za GeneXpert Dx softver na Windows® radnoj površini.
 - ili
 - Ako koristite GeneXpert Infinity instrument, uključite instrument. GeneXpert softver će se automatski pokrenuti ili će možda biti potrebno dvaput kliknuti na ikonu za Xpertise softver na Windows radnoj površini.
2. Prijavite se na softver sistema instrumenta GeneXpert koristeći svoje korisničko ime i lozinku. U prozoru GeneXpert sistem, kliknite na **Kreiraj test (Create Test)** (GeneXpert Dx) ili kliknite na **Nalozi (Orders)** i **Nalog za test (Order Test)** (Infinity). Otvara se prozor Kreiraj test (Create Test).
3. Skenirajte ili unesite ID uzorka (Sample ID). Ako unosite ID uzorka (Sample ID), pobrinite se da ID uzorka (Sample ID) bude tačno unet. ID uzorka (Sample ID) je povezan sa rezultatima testa i prikazuje se u prozoru View Results (Prikaz rezultata) i svim izveštajima. Pojavljuje se dijalog Skeniraj patronu (Scan Cartridge).

4. Skenirajte bar-kod na Xpert Breast Cancer STRAT4 patroni. Otvara se prozor Kreiraj test (Create Test). Korišćenjem informacija sa bar-koda, softver automatski popunjava sledeća polja: Izbor testa (Select Assay), ID serije reagensa (Reagent Lot ID), Serijski broj patrone (Cartridge SN).
5. Kliknite na **Započni test (Start Test)** (GeneXpert Dx) ili **Prosledi (Submit)** (Infinity). Ako se traži, unesite svoju lozinku.
6. Za GeneXpert Dx instrument:
 - a) Otvorite vrata modula instrumenta na kojima trepće zeleno svetlo i ubacite patronu.
 - b) Zatvorite vrata. Test započinje i zeleno svetlo prestaje da trepće. Kada je test završen, svetlo se gasi.
 - c) Sačekajte dok sistem ne otpusti bravu vrata pre nego što otvorite vrata modula. Uklonite patronu.
 - d) Bacite iskorišćene patrone u odgovarajuće kontejnere za otpad u skladu sa standardnom praksom vaše ustanove. Pogledajte Odeljak 9.

ili

Za GeneXpert Infinity sistem, patronu postavite na pokretnu traku. Patrona će se automatski ubaciti, test će se pokrenuti, a iskorišćena patrona će biti postavljena u kontejner za otpad.

13 Prikazivanje i štampanje rezultata

Ovaj odeljak navodi osnovne korake za prikazivanje i štampanje rezultata. Za detaljnija uputstva o prikazivanju i štampanju rezultata, pogledajte *GeneXpert Dx sistem priručnik za operatera* ili *GeneXpert Infinity sistem priručnik za operatera*, u zavisnosti od instrumenta koji se koristi.

1. Kliknite na ikonu **Prikaz rezultata (View Results)** da biste prikazali rezultate.
2. Nakon završetka testa, kliknite na **dugme Izveštaj (Report)** u prozoru Prikaz rezultata (View Results) da biste pogledali i/ili generisali PDF datoteku izveštaja.

Напомена

Ako koristite ONCore softver za generisanje izveštaja, pogledajte GeneXpert ONCore softver korisnički priručnik na ONCore CD-u sa korisničkim priručnikom za uputstva o tome kako generisati izveštaj. Takođe pogledajte ONCore Uputstvo za izveštaj na Xpert Breast Cancer STRAT4 CD-u za uputstva o tome kako da tumačite ONCore izveštaj za Xpert Breast Cancer STRAT4 test.

14 Kontrola kvaliteta

Svaki test sadrži kontrolu referentnog gena (*CYFIP1*) i kontrolu provere probe (PCC).

- **CYFIP1 kontrola:** Ovaj referentni gen se koristi za normalizaciju nivoa ekspresije *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67*. Takođe služi kao kontrola adekvatnosti uzorka (SAC) što osigurava da uzorak sadrži dovoljno RNK. Potreban je minimalan *CYFIP1* signal za važeći rezultat testa. *CYFIP1* signal ispod minimalne količine ili negativan signal, ukazuju na to da uzorci ne sadrže dovoljno RNK.
- **CYFIP1 alternativno:** Ovo je duplikat *CYFIP1* kontrole koji se koristi u algoritmu kad je prag delta ciklusa (dCt) PGR ili *MKi67* ispod podešenog preseka analize. Za ove ciljeve, potreban je dodatni minimum *CYFIP1* alternativnog signala, kako bi se osigurao važeći rezultat testa.
- **Kontrola provere probe (PCC):** Pre početka PCR reakcije, GeneXpert sistem instrumenata meri fluorescentni signal sa proba kako bi nadgledao rehidraciju zrna, punjenje reakcione epruvete, integritet probe i stabilnost boje. PCC je uspešna ako su kriterijumi za prihvatanje ispunjeni.
- **Spoljne kontrole (nije priloženo):** Spoljne kontrole treba koristiti u skladu sa lokalnim, državnim i saveznim zahtevima organizacija za akreditaciju, prema potrebi.

15 Tumačenje rezultata

Rezultati se tumače automatski putem sistema GeneXpert sistema instrumenata na osnovu izmerenih fluorescentnih signala i ugrađenih algoritama za izračunavanje i jasno su prikazani u prozoru Prikaz rezultata (View Results) na karticama Rezultati testa (Test Results) i Rezultat analita (Analyte Result). Rezultat testa (Test Result) i Rezultati analita (Analyte Results) takođe su prikazani u Izveštaju testa (Test Report). Mogući rezultati su prikazani u Tabela 1 i Tabela 2.

Tabela 1. Svi mogući rezultati za Xpert Breast Cancer STRAT4 test

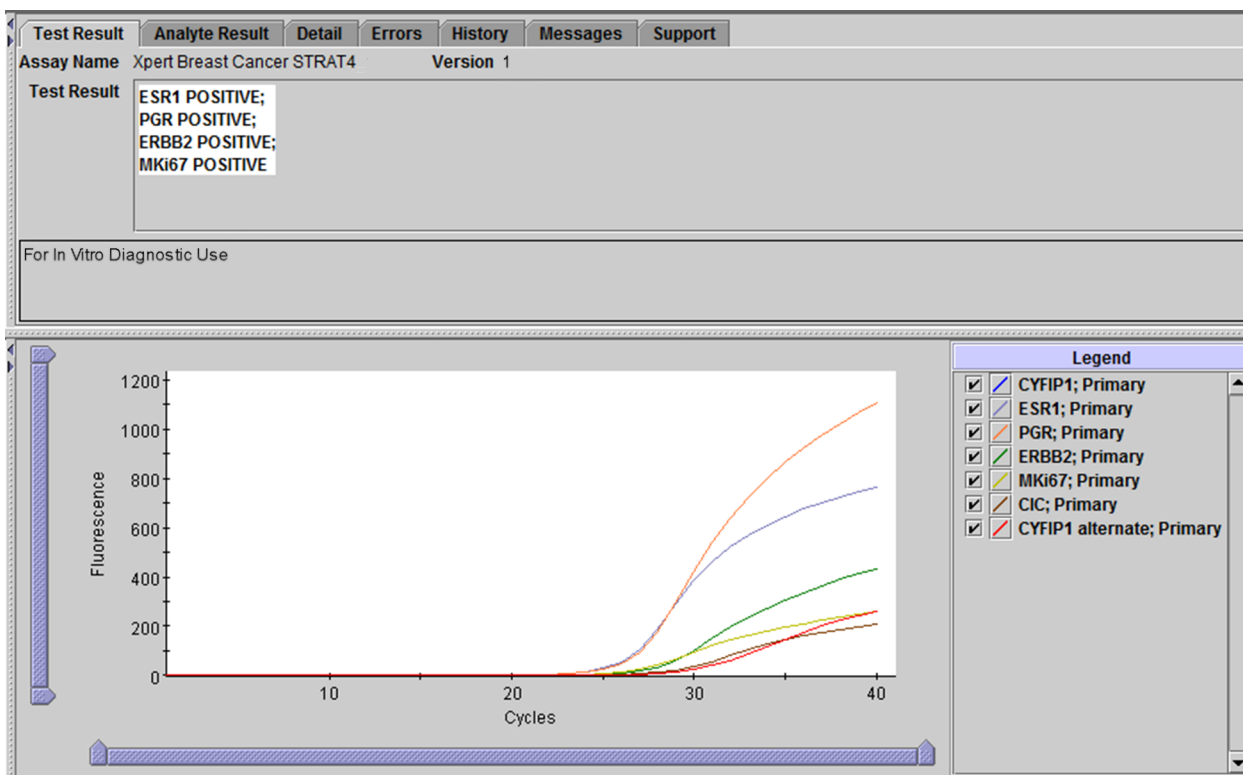
Prikazani rezultat	CYFIP1	CYFIP1 alternativno	CIC
<i>ESR1</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>ESR1</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>PGR</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>PGR</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ.	POZ. ili NEG.
<i>ERBB2</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>ERBB2</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>MKi67</i> POZITIVNO (POSITIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	POZ. ili NEG.
<i>MKi67</i> NEGATIVNO (NEGATIVE)	USPEŠNO (PASS)	POZ.	POZ. ili NEG.
<i>PGR</i> NEODREĐENO (INDETERMINATE)	USPEŠNO (PASS)	NEG.	POZ. ili NEG.
<i>MKi67</i> NEODREĐENO (INDETERMINATE)	USPEŠNO (PASS)	NEG.	POZ. ili NEG.
PONOVNI TEST (REPEAT TEST)	USPEŠNO (PASS)	POZ. ili NEG.	NEG.
NEVAŽEĆI (INVALID)	NEUSPEŠNO (FAIL)	NEG.	POZ. ili NEG.
GREŠKA (ERROR)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)
NEMA REZULTATA (NO RESULT)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	NEMA REZULTATA (NO RESULT)

Tabela 2. Xpert Breast Cancer STRAT4 reprezentativni rezultati i tumačenje

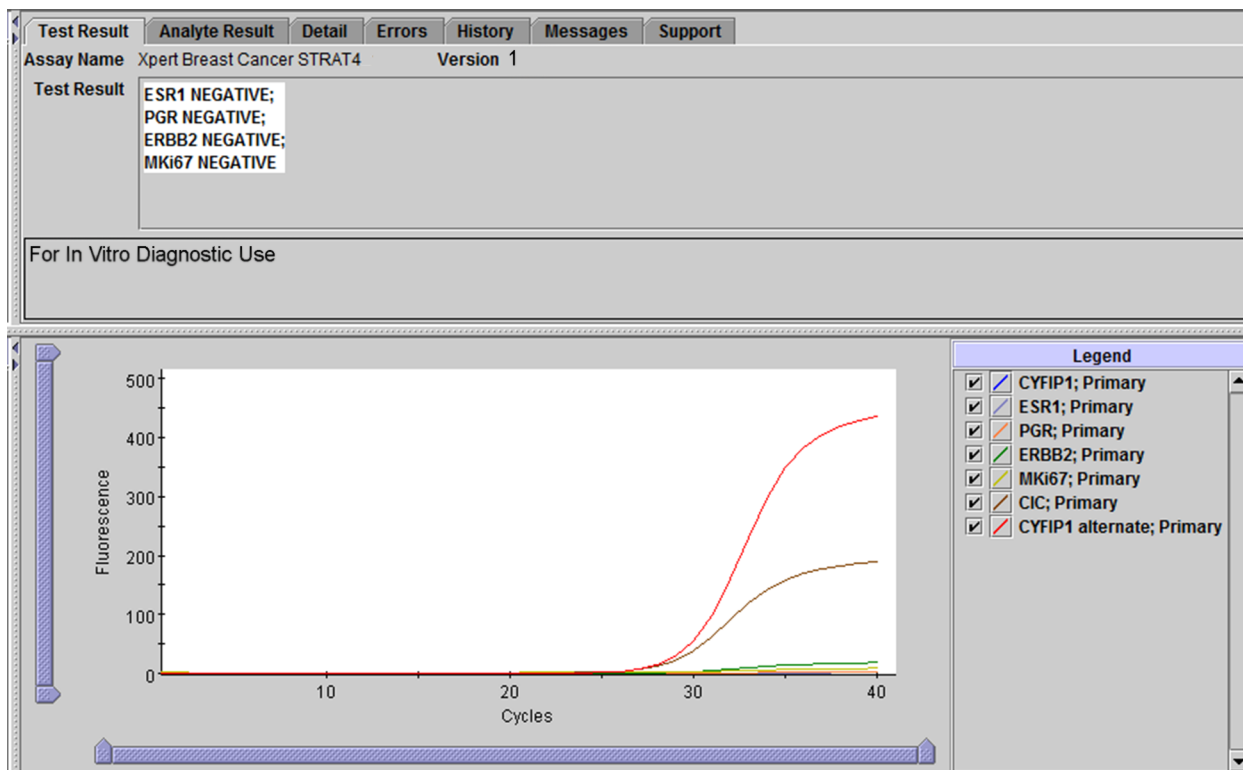
Rezultat	Tumačenje
<p>ESR1 POZITIVNO (POSITIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i> mRNA transkript je prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) iznad podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>PGR POZITIVNO (POSITIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> mRNA transkript je prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) iznad podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>ERBB2 POZITIVNO (POSITIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i> mRNA transkript je prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) iznad podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>MKi67 POZITIVNO (POSITIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> mRNA transkript je prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) iznad podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>ESR1 NEGATIVNO (NEGATIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i> mRNA transkript nije prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) ispod podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>PGR NEGATIVNO (NEGATIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> mRNA transkript nije prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) ispod podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – POZ.; <i>CYFIP1</i> ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.

Rezultat	Tumačenje
<p>ERBB2 NEGATIVNO (NEGATIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i> mRNK transkript nije prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) ispod podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>MKi67 NEGATIVNO (NEGATIVE)</p> <p>Pogledajte Slika 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> mRNK transkript nije prekomerno ekspresovan i ima prag delta ciklusa (dCt) ispod podešenog preseka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – POZ.; <i>CYFIP1</i> ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>PGR Neodređeno (Indeterminate)</p> <p>Pogledajte Slika 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> nivo ekspresije mRNK ne može biti određen jer uzorak sadrži nedovoljno materijala. Ponovite test pomoću koncentrovanijeg lizata. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – NEG.; <i>CYFIP1</i> prag ciklusa (Ct) nije u okviru važećeg opsega ili je krajnja tačka bila ispod podešenog praga koji je potreban za određivanje PGR statusa. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>MKi67 Neodređeno (Indeterminate)</p> <p>Pogledajte Slika 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> nivo ekspresije mRNK ne može biti određen jer uzorak sadrži nedovoljno materijala. Ponovite test pomoću koncentrovanijeg lizata. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – NEG.; <i>CYFIP1</i> prag ciklusa (Ct) nije u okviru važećeg opsega ili je krajnja tačka bila ispod podešenog praga koji je potreban za određivanje MKi67 statusa. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
<p>PONOVNI TEST (REPEAT TEST)</p> <p>Pogledajte Slika 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nivoi ekspresije mRNK ne mogu biti određeni. Ponovite test pomoću alikvota preostalog lizata FFPE uzorka. • <i>CYFIP1</i> – USPEŠNO (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan i ima prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – POZ./NEG.; <i>CYFIP1</i> mRNK transkript je detektovan. Transkript može ili ne mora imati prag ciklusa (Ct) u okviru važećeg opsega i krajnju tačku iznad podešenog praga. • CIC – NEG.; unutrašnja kontrola ima prag ciklusa (Ct) izvan važećeg opsega. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.

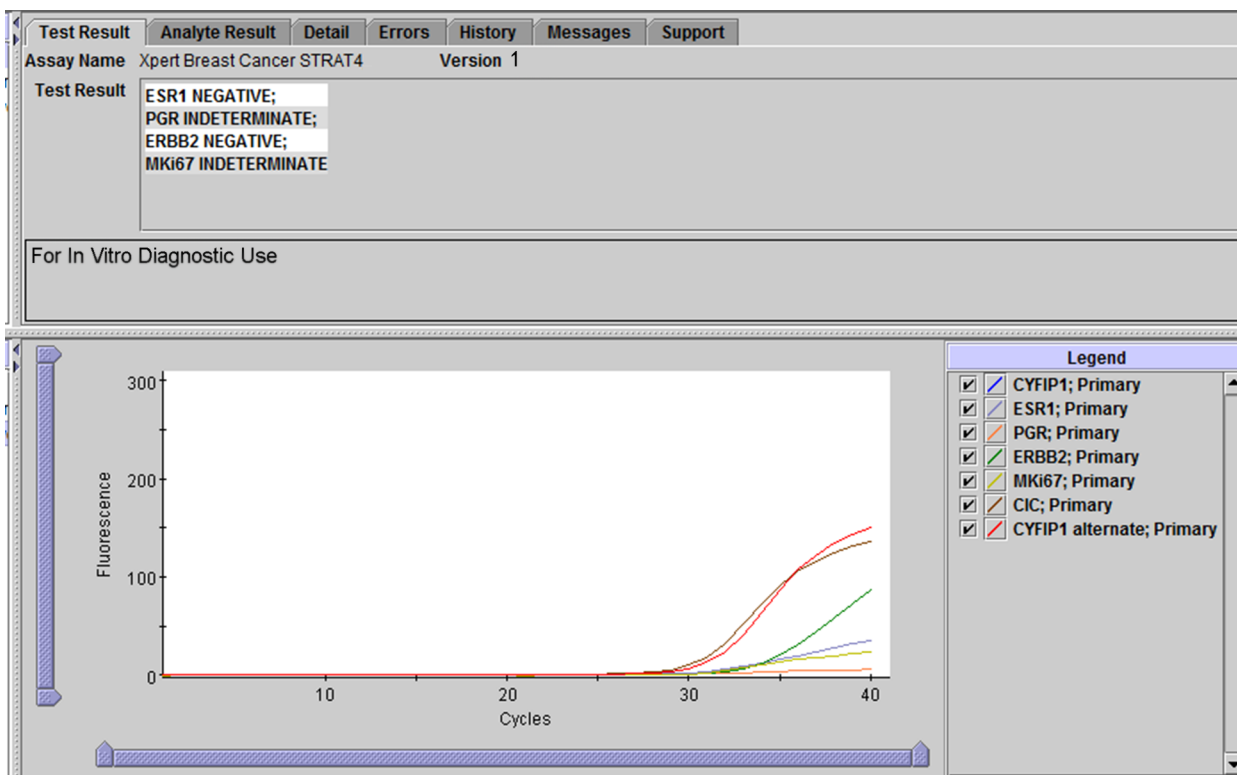
Rezultat	Tumačenje
NEVAŽEĆI (INVALID)	<ul style="list-style-type: none"> • NEVAŽEĆI (INVALID) – <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nivoi ekspresije mRNA ne mogu biti određeni jer uzorak sadrži nedovoljno materijala. Ponovite test pomoću koncentrovanijeg lizata. • <i>CYFIP1</i> – NEUSPEŠNO (FAIL); <i>CYFIP1</i> prag ciklusa (Ct) nije u okviru važećeg opsega ili je krajnja tačka bila ispod podešenog praga. • <i>CYFIP1</i> alternativno – NEG.; <i>CYFIP1</i> prag ciklusa (Ct) nije u okviru važećeg opsega ili je krajnja tačka bila ispod podešenog praga. • Provera probe – USPEŠNO (PASS); svi rezultati provere probe su uspešni.
GREŠKA (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nivoi ekspresije mRNA ne mogu biti određeni. Ponovite test pomoću alikvota preostalog lizata FFPE uzorka. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NEMA REZULTATA (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativno – NEMA REZULTATA (NO RESULT) • Provera probe – USPEŠNO (PASS)*/NEUSPEŠNO (FAIL); svi ili jedan od rezultata provere probe je neuspešan. <p style="margin-left: 40px;">* Ako je provera probe uspešna, grešku uzrokuje maksimalno prekoračenje pritiska koje prelazi prihvatljivi opseg, greška u uklapanju krivulje ili kvar sistemske komponente.</p>
NEMA REZULTATA (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> nivoi ekspresije mRNA ne mogu biti određeni. Prikupljeno je nedovoljno podataka za proizvodnju rezultata testa. Na primer, ovo se može dogoditi ako je operater zaustavio test dok je on bio u toku. Ponovite test pomoću preostalog lizata FFPE uzorka. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – NEMA REZULTATA (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativno – NEMA REZULTATA (NO RESULT) • Provera probe – NP (nije primenjivo) (NA (not applicable))



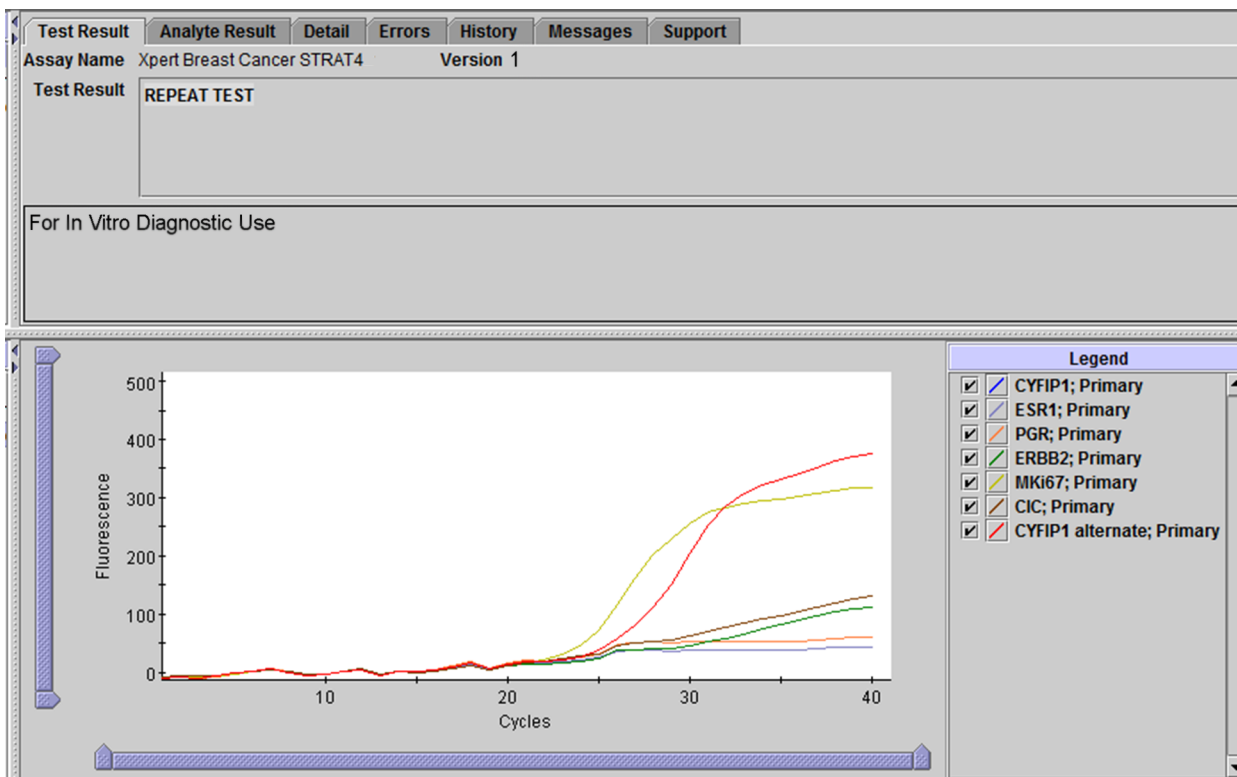
Slika 2. GeneXpert Dx prozor Prikaz rezultata (View results): ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNO (POSITIVE)



Slika 3. GeneXpert Dx prozor Prikaz rezultata (View results): ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNO (NEGATIVE)



Slika 4. GeneXpert Dx prozor Prikaz rezultata (View results): PGR/MKi67 NEODREĐENO (INDETERMINATE)



Slika 5. GeneXpert Dx prozor Prikaz rezultata (View results): PONOVNI TEST (REPEAT TEST)

16 Razlozi za ponavljanje testa

Ponovite test pomoću nove patrone (nemojte ponovo koristiti patronu).

- Rezultat **PONOVNOG TESTA (REPEAT TEST)** ukazuje na neuspeh unutrašnje kontrole. Uzorak nije pravilno obrađen. U ovom slučaju, ponovite test pomoću novog alikvota od 520 µl iz istog FFPE lizata.
- **NEVAŽEĆI (INVALID)** rezultat ukazuje na neuspeh referentne kontrole. Uzorak nije pravilno obrađen, PCR je inhibirana, ili je kvalitet RNK iz tumora kome je pristupljeno neodgovarajuća. U tom slučaju, ponovite test pomoću koncentrovanijeg FFPE lizata prema uputstvima u uputstvu za upotrebu FFPE kompleta za lizu.
- Rezultat **GREŠKA (ERROR)** ukazuje na to da je kontrola provere probe neuspešna i da je test obustavljen, moguće usled nepravilno napunjene reakcione epruvete, ili je detektovan problem sa integritetom reagensa probe, ili jer su prekoračena maksimalna ograničenja za pritisak, ili je detektovana greška u pozicioniranju ventila. U ovom slučaju, ponovite test pomoću novog alikvota od 520 µl iz istog FFPE lizata.
- **NEMA REZULTATA (NO RESULT)** znači da nije prikupljeno dovoljno podataka. Na primer, operater je zaustavio test koji je bio u toku ili je došlo do nestanka struje. U ovom slučaju, ponovite test pomoću novog alikvota od 520 µl iz istog FFPE lizata.
- Ako performanse spoljne QC ne budu onakve kakve se očekuju, ponovite test spoljne kontrole i/ili se obratite kompaniji Cepheid za pomoć.

17 Ograničenja

- Modifikacije ovih postupaka mogu izmeniti performanse testa. Rezultate Xpert Breast Cancer STRAT4 treba tumačiti zajedno sa ostalim laboratorijskim i kliničkim podacima dostupnim lekaru.
- Performanse Xpert Breast Cancer STRAT4 potvrđene su pomoću postupaka koji se nalaze u ovom uputstvu za upotrebu i pomoću FFPE uzoraka koji su stari pet do deset godina.
- Performanse Xpert Breast Cancer STRAT4 potvrđene su samo pomoću postupaka navedenih u ovom uputstvu za upotrebu.
- Pogrešni rezultati testa se mogu dogoditi prilikom nepravilnog prikupljanja uzorka, rukovanja i skladištenja, ili prilikom zamene uzoraka. Da bi se izbegli pogrešni rezultati, neophodno je pažljivo poštovanje uputstava u ovom uputstvu za upotrebu.
- Karakteristike performansi nisu utvrđene za pacijente koji su mladi od 25 godina.
- Mutacije ili polimorfizam u regionima vezivanja prajmera ili proba, mogu dovesti do pogrešnih ali uverljivih rezultata za *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* i *MKi67*.

18 Karakteristike performansi

18.1 Kliničke performanse

Karakteristike performansi za Xpert Breast Cancer STRAT4 test procenjene su u odnosu na IHC rezultate za ER, PR, HER2 i Ki67 i u odnosu na hibridizaciju fluorescencije *in situ* (FISH) za amplifikaciju HER2 gena na lokacijama u SAD i EU. Na početku je u ovu studiju bilo uključeno ukupno 211 neidentifikovanih preostalih FFPE uzoraka primarnog invazivnog karcinoma dojke. 10 uzoraka je isključeno jer nije bilo dostupno dovoljno tumorskog tkiva za testiranje, a jedan uzorak je isključen zbog povučenog pristanka. Tako je bilo dostupno ukupno 200 uzoraka za uključivanje u analize podataka. Za svaki FFPE uzorak pripremljeno je više pločica za Xpert testiranje; za IHC testiranje ER, PR, HER2 i Ki67; i za FISH testiranje amplifikacije HER2 gena.

Sveukupno, Xpert Breast Cancer STRAT4 pružio je važeće rezultate pri prvom pokušaju testiranja od 99,5% (199/200) za studijske uzorke. Jedan uzorak koji je inicijalno davao neodređeni rezultat (**GREŠKA (ERROR)**, **NEVAŽEĆI (INVALID)** ili **NEMA REZULTATA (NO RESULT)**) dao je rezultat testa nakon jednog ponovnog testiranja. Sveukupna stopa uspešnosti analize bila je 100,0% (200/200).

Od 200 uzoraka sa važećim Xpert rezultatom testa, ESR1 i ERBB2 dali su važeći pozitivan ili negativan rezultat testa u 100% vremena (200/200). Za PGR i MKi67, Xpert je dao važeći pozitivan ili negativan rezultat testa u 98,5% (197/200), odnosno u 97,0% (194/200) slučajeva. 7 uzoraka sa Xpert neodređenim rezultatima za PGR i/ili MKi67 bilo je ponovo testirano pomoću metode koncentrovanog FFPE lizata. I originalni (prvi pokušaj) rezultati i rezultati ponovljenog testa prikazani su u Tabela 3.

Za celokupan skup podataka, uključujući rezultate ponovnog testiranja, Xpert Breast Cancer STRAT4 demonstrirao je procenat pozitivnog slaganja (PPA) od 97,2%, procenat negativnog slaganja (NPA) od 95,0% i procenat sveukupnog slaganja (OPA) od 97,0% za ESR1 u odnosu na IHC;¹⁸ PPA od 88,4%, NPA od 90,7% i OPA od 88,9% za PGR u odnosu na IHC;¹⁸ PPA od 100,0%, NPA od 92,4% i OPA od 93,3% za ERBB2 u odnosu na IHC;¹⁹ i PPA od 100%, NPA od 92,0% i OPA od 93,3% za ERBB2 u odnosu na HER2 FISH.¹⁹ Za MKi67 PPA od 88,8%, NPA od 100% i OPA od 90,7% sa IHC pragom podešenim na >20% za pozitivno i <10% za negativno. MKi67 IHC srednji uzorci (10%-20% prag, zaključno) isključeni su iz analize. Sveukupan PPA, NPA ili OPA za svaki cilj, prikazani su u Tabela 3.

Tabela 3. Kliničke performanse

Upoređivanje	Skup podataka ^a	Ukupno (n) ^b	PPA	95% CI	NPA	95% CI	OPA	95% CI
ESR1/ER Xpert naspram IHC	Originalno	199	97,2% (174/179)	93,6–98,8	100% (20/20)	83,9–100	97,5% (194/199)	94,3–98,9
	Ponovljeni test	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 naspram IHC	Originalno	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
	Ponovljeni test	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 naspram IHC	Originalno	180	100% (22/22)	85,1–100	92,4% (146/158)	87,2–95,6	93,3% (168/180)	88,7–96,1
	Ponovljeni test	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 naspram FISH	Originalno	178	100% (28/28)	87,9–100	92,0% (138/150)	86,5–95,4	93,3% (166/178)	88,6–96,1
	Ponovljeni test	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 naspram IHC + FISH	Originalno	197	100% (27/27)	87,5–100	91,2% (155/170)	86,0–94,6	92,4% (182/197)	87,8–95,3
	Ponovljeni test	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 naspram IHC	Originalno	148	88,7% (110/124)	81,9–93,2	100% (24/24)	86,2–100	90,5% (134/148)	84,7–94,3
	Ponovljeni test	151	88,8% (111/125)	82,1–93,2	100% (26/26)	87,1–100	90,7% (137/151)	85,0–94,4

^a Originalno = 1X lizat u skladu sa uputstvima u uputstvu za upotrebu, Ponovljeni test = rezultat ponovljenog testa na 4X koncentrovanom lizatu u slučajevima u kojima je originalni uzorak (1X lizat) dao neodređeni rezultat za PGR i/ili MKi67.

^b Uzorci sa neodređenim Xpert rezultatima, uzorci sa ekvivalnim ili srednjim IHC rezultatima, uzorci sa neuspešnim IHC i neuspešnim FISH su isključeni.

19 Analitičke performanse

19.1 Analitička senzitivnost/minimalni unos za analizu

Minimalni unos za analizu određen je procenom maksimalne CYFIP1 Ct (referentni gen), koja precizno određuje potreban unos uzorka za grube performanse analize. Unos uzorka osigurava dobijanje važećih rezultata za većinu testiranih FFPE kliničkih uzoraka. Uzorci sa CYFIP1 Ct vrednošću većom od dozvoljene biće generisani kao **NEVAŽEĆI (INVALID)** rezultat.

Analitička osetljivost/minimalni unos za analizu za Xpert Breast Cancer STRAT4 test, definisano kao maksimalna CYFIP1 Ct koja daje ≥95% važećih rezultata, utvrđeni su pomoću razblaženih lizata FFPE kliničkih uzoraka, kako bi se testirala CYFIP1 Ct. Da bi se procenila senzitivnost CYFIP1 Ct, lizat FFPE kliničkog uzorka je serijski razblažen i testiran sa N=20 replikata prema nivou razblaženja tokom 3 dana dok ≤95% rezultata testova nije bilo važeće. Nivoi razblaženja uključivali su jedan uzorak sa očekivanim minimalnim unosom za analizu, dva uzorka sa nivoom ispod toga i dva uzorka sa nivoom iznad. Testiranje je objavljeno na dve serije Xpert Breast Cancer STRAT4 patrona.

Pre započinjanja studije, obavljeno je testiranje na prazno za određivanje granice sa N=60 replikata pomoću dve nezavisne serije Xpert Breast Cancer STRAT4 patrona. Granica za prazne uzorke sastojala se od praznog odeljka za parafin (nema uzorka tkiva) i svi rezultati su pokazali očekivane NEVAŽEĆE (**NEVAŽEĆI (INVALID)**) rezultate. Serijska razblaženja unosa kliničkog FFPE uzorka tkiva pri razblaženju od 1:1000, dala su 20/20 važećih CYFIP1 Ct sa srednjom Ct = 33,4 i SD 0,6 iz serije 1 Xpert Breast Cancer STRAT4 testa i srednju Ct = 33,6 i SD 0,5 iz serije 2. Dalja razblaženja sa kasnijim CYFIP1 Ct vrednostima nisu uspela da ispune $\geq 95\%$ važećih rezultata, potrebnih za studiju. Tabela 4 sumira broj važećih ciklusa testova za svaki nivo unosa serijski razblaženog uzorka, kao relativno razblaženje ili kao Srednja CYFIP1 Ct. Analitička senzitivnost pomoću dve serije Xpert Breast Cancer STRAT4 test patrona, demonstrirala je minimalan potreban unos za analizu za CYFIP1 Ct = 33,4. Ova vrednost u kombinaciji sa varijabilnošću analize, omogućuje da gornja granica Xpert Breast Cancer STRAT4 testa bude podešena na CYFIP1 Ct = 35.

Tabela 4. Minimalni unos za analizu za Xpert Breast Cancer STRAT4

Serijska kompleta	Unos uzorka (relativno razblaženje)	Srednja CYFIP1 Ct	SD	N važeći ciklus (Ct \leq 35)
00801 (serija 1)	1/20	27,6	0,4	20/20
	1/100	29,8	0,3	20/20
	1/1000	33,4	0,6	20/20
	1/2000	34,2	0,5	9/20
	1/4000	34,5	0,5	2/20
	NTC	n/a	n/a	0/20
00903 (serija 2)	1/20	27,8	0,3	20/20
	1/100	30,0	0,3	20/20
	1/1000	33,6	0,5	20/20
	1/2000	34,2	0,4	9/20
	1/4000	34,6	0,0	1/20
	NTC	n/a	n/a	0/20

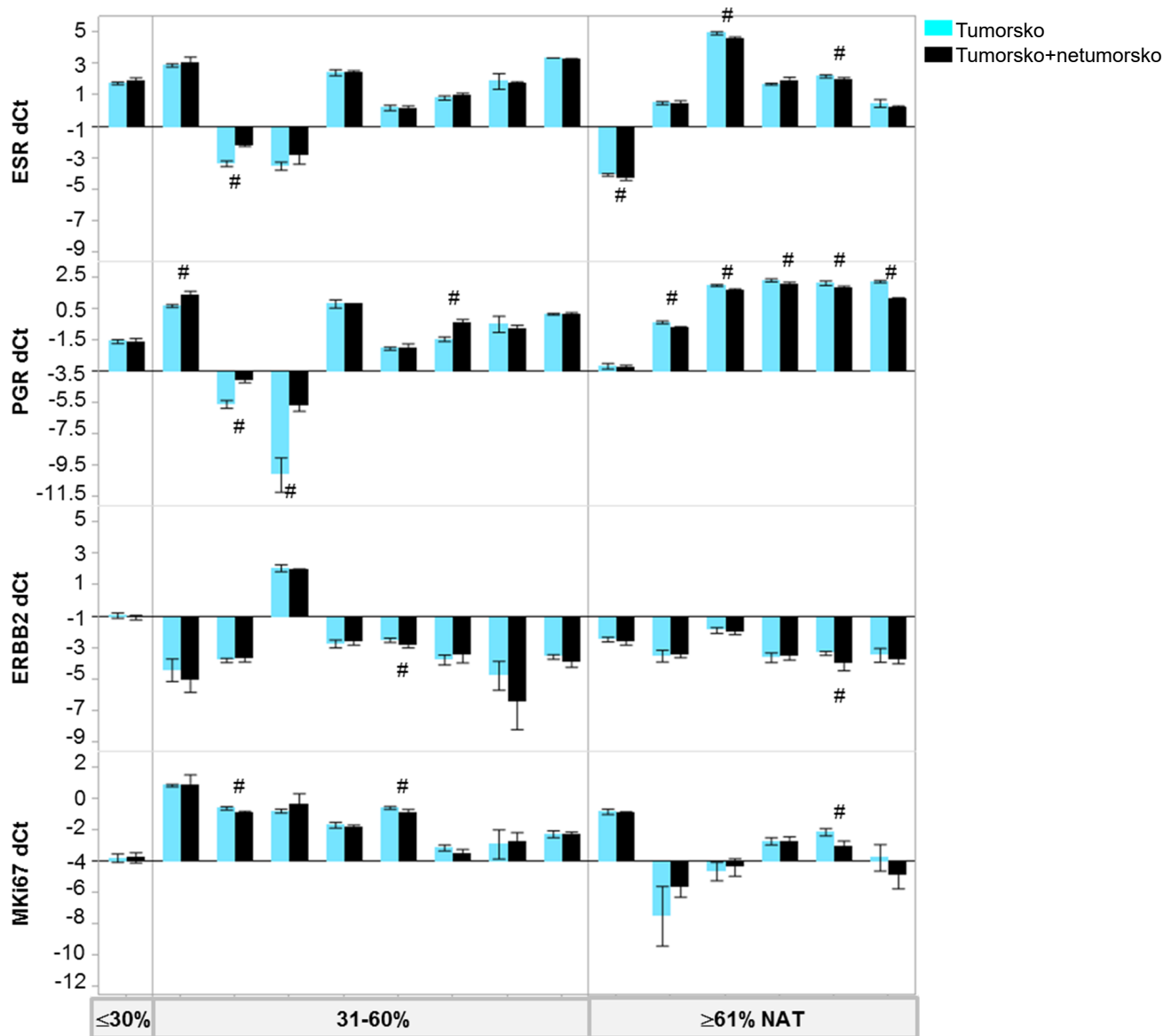
19.2 Ometanje testiranja

Okolno normalno/netumorsko tkivo

Okolno normalno (netumorsko) tkivo često je prisutno u uzorcima tkiva karcinoma dojke kao kontaminirajuća supstanca, koja potencijalno može ometati detekciju specifičnog cilja. Xpert Breast Cancer STRAT4 test može zahtevati makrodisektovani patološki potvrđen FFPE isečak tumora dojke, kako bi se potencijalni efekti ometanja netumorskim tkivom sveli na minimum u primenjivim slučajevima, kako je odredio patolog. Da bi se procenio efekat okolnog normalnog/netumorskog tkiva, testirano je petnaest (15) FFPE blokova tkiva invazivnog karcinoma dojke, koji su sadržali 21-98% okružujućeg NAT, pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa sa i bez makrodisekcije. Xpert Breast Cancer STRAT4 testiranje je obavljeno sa N=4 replikata iz istog lizata po stanju. Najpre su procenjene dCts ESR1, PGR, ERBB2 i MKi67 za svaki uzorak tkiva sa makrodisekcijom (trakasti grafikon u plavoj boji) ili bez makrodisekcije (grafikon u crnoj boji) putem jednosmerne ANOVA analize, kako bi se odredilo statističko ometanje od strane NAT. Klinički značajno ometanje od strane NAT je smatrano prisutnim kad je ddCt (delta-delta Ct) između makrodisektovanog tkiva i tkiva bez makrodisekcije bila $>1,0$ i kad je postojala promena u rezultatu testa. Rezultati studije su sumirani u Slika 6.

dCts ESR1, PGR, ERBB2 i MKi67 za svih 15 uzoraka bile su grupisane na osnovu % NAT ($\leq 30\%$, 31-60%, ili $\geq 61\%$). Vertikalni grafikoni u plavoj i crnoj boji sa SD predstavljaju srednji cilj za dCts iz N=4 replikata makrodisektovanih i nemakrodisektovanih FFPE isečaka za FFPE blok invazivnog karcinoma dojke. Svih 15 FFPE blokova (N=1 ispod 30% NAT, N=8 sa 31-60% NAT i N=6 iznad 60% NAT) pokazali su ili da nema statistički značajne razlike za ometanje okolnim normalnim/netumorskim tkivom na osnovu jednosmerne ANOVA analize sa p-vrednošću $\geq 0,05$; ili da nema klinički značajne razlike (označeno kao br.), ako je varijacija u delta Ct vrednostima za svaki cilj između makrodisektovanih ili nemakrodisektovanih uzoraka bila $\leq 1,0$, ili kada se na ciljane rezultate testa (pozitivno, negativno) nije uticalo.

Slika 6. Ometanje okolnim normalnim/netumorskim tkivom ciljanih dCts za Xpert Breast Cancer STRAT4



DCIS, nekrotično, hemoragično tkivo

Da bi se procenio efekat duktalnog karcinoma in situ (DCIS), nekrotičnog i hemoragičnog tkiva, ukupno 9 FFPE uzoraka tumora dojke (3 FFPE bloka tumora dojke koji sadrže 3-61% DCIS, 3 FFPE bloka koji sadrže 10-65% nekrotičnog tkiva i 3 FFPE bloka koji sadrže 15-41% hemoragičnog tkiva) testirano je pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa sa i bez makrodisekcije. Xpert Breast Cancer STRAT4 test je obavljen sa N=4 replikata iz istog lizata po stanju. Za sva stanja testa je pronađeno da nemaju statistički ili klinički značajan uticaj iz različitih DCIS, nekrotičnog ili hemoragičnog kontaminiranog tkiva pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa (grafički podaci nisu prikazani).

Humana genomska DNK (hgDNK)

Xpert Breast Cancer STRAT4 test koristi visoko specifične prajmere i probe za efikasnu hibridizaciju sa ciljanim ESR1, PGR, ERBB2 i MKi67 mRNK predlošcima iz pula genomske nukleinske kiseline (humana genomska DNK = hgDNK). Za procenu efekta hgDNK na Xpert Breast Cancer STRAT4 testu, 10 FFPE blokova tumora dojke sa različitim sadržajem ćelija invazivnog duktalnog karcinoma je makrodisektovano i testirano sa i bez dodavanja 25 ng hgDNK u FFPE lizate uzoraka pomoću Xpert Breast Cancer STRAT4 testa u N=4 replikata iz istog lizata po stanju. Za sva stanja testa je pronađeno da nemaju statistički ili klinički značajan uticaj pri ometanju hgDNK (grafički podaci nisu prikazani).

19.3 Prenosjenre kontaminacije

Sprovedena je studija da bi se demonstriralo da GeneXpert samostalne patrone za jednokratnu upotrebu svode prenos kontaminacije na minimum sa visoko pozitivnih uzoraka nakon kojih sledi ciklus negativnih uzoraka u istom GeneXpert modulu. Studija se sastojala od negativnog uzorka obrađenog u istom GeneXpert modulu, odmah nakon visoko pozitivnog ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 uzorka. Negativan uzorak se sastojao od *in vitro*-transkribovane (IVT) RNK koja je sadržala CYFIP1 transkript sa 5×10^4 kopija, kako bi se osiguralo prisustvo cilja referentnog gena. Visoko pozitivan uzorak se sastojao od IVT RNK koja je sadržala CYFIP1 transkript sa 5×10^5 kopija i IVT RNK koja je sadržala ESR1, PGR, ERBB2 i MKi67 transkripte sa 5×10^6 kopija, pripremljeno kao FFPE lizat. Šema testiranja ponovljena je 41 put pomoću jednog GeneXpert modula za ukupno 20 visoko pozitivnih uzoraka i 21 visoko negativan uzorak. Svih 20 visoko pozitivnih uzoraka je tačno prijavljeno kao ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POZITIVNO (POSITIVE), a svih 21 negativnih uzoraka je tačno prijavljeno kao ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVNO (NEGATIVE).

19.4 Reproducibilnost i preciznost analize

Reproducibilnost za Xpert Breast Cancer STRAT4 procenjena je pomoću panela od pet lizata uzoraka.

Tri člana panela pripremljena su dodavanjem *in vitro* transkripta (IVT) RNK u FFPE pufer za lizu, spajkovan u okviru ~2dCts dCt preseka za ESR1 (1 IVT RNK), PGR (2 IVT RNK) i ERBB2 (3 IVT RNK) sa CYFIP1 Ct vrednostima ~2-3 Cts iz nivoa minimalnog unosa za analizu.

Dva člana panela (klinički FFPE uzorak 4 i klinički FFPE uzorak 5) kreirana su iz pulovanih kliničkih FFPE uzoraka u FFPE puferu za lizu, kako bi se dobile CYFIP1 Ct vrednosti blizu minimalnog unosa za analizu i kako bi imale dCt vrednosti preseka za sve ciljeve širom prijavljenog opsega i što je moguće bliže dCt presecima analize.

Dva operatera na svakoj od tri studijske lokacije, testirala su dva panela od pet uzoraka dnevno u toku šest dana testiranja (pet uzoraka x šest dana x dva operatera x dva replikata x tri lokacije). Testirano je ukupno 72 replikata po uzorku. Korišćene su tri serije Xpert Breast Cancer STRAT4 patrona na svakoj od tri test lokacije. Xpert Breast Cancer STRAT4 test izveden je u skladu sa postupkom u ovom uputstvu za upotrebu.

Reproducibilnost za Xpert Breast Cancer STRAT4 procenjena je u smislu dCt za sva četiri cilja za svaki panel. Srednja, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) između lokacija, između serija, između dana, između operatera i u okviru analiza za svakog člana panela, prikazani su u Tabela 5.

Tabela 5. Sažetak podataka reproducibilnosti

Uzorak	Kanal analize (analit)	N ^a	Srednja dCt	Između lokacija		Između serija		Između dana		Između operatera		U okviru analize		Ukupno	
				Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)
1-IVT RNK	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 RNK	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 RNK	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 klinički uzorak	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

Uzorak	Kanal analize (analit)	N ^a	Srednja dCt	Između lokacija		Između serija		Između dana		Između operatera		U okviru analize		Ukupno	
				Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)	Var.	CV (%)
5- FFPE klinički uzorak	ESR1	72	-2,83	0,00	0,00	0,05	13,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	86,30	0,39	0,63
	PGR	72	-5,66	0,00	0,00	0,02	3,60	0,03	4,40	0,00	0,00	0,56	92,00	0,60	0,78
	ERBB2	72	1,93	0,00	2,90	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	94,20	0,03	0,17
	MKI67	72	-1,57	0,00	1,70	0,01	17,10	0,01	9,00	0,00	11,10	0,05	61,10	0,09	0,29

^a Rezultati sa važećim delta Ct vrednostima od 72

20 Reference

- American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
- 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, 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
- 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.
- UREDBA (EZ) br. 1272/2008 EVROPSKOG PARLAMENTA I SAVETA od 16. decembra 2008. o klasifikacionom označavanju i pakovanju supstanci i smeša koje menja i ukida Listu izjava o predostrožnosti, Direktive 67/548/EEZ i 1999/45/EZ (izmena Uredbe (EZ) br. 1907/2006).

17. Standardi zaštite na radu i zdravlja, Prenos informacija o opasnostima, toksičnim i opasnim supstancama (26. marta 2012.) (29 C.F.R., pt. 1910, podtačka 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 Lokacije sedišta kompanije Cepheid

Sedišta kompanije

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Sedišta u Evropi

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Tehnička pomoć

Prikupite sledeće informacije pre nego što se obratite tehničkoj podršci kompanije Cepheid:

- Naziv proizvoda
- Broj partije
- Serijski broj instrumenta
- Poruke o greškama (ako ih ima)
- Verzija softvera i ako je primenljivo, broj servisne oznake računara

Sjedinjene Države




Telefon: + 1 888 838 3222
Adresa e-pošte: techsupport@cepheid.com















Francuska

Telefon: + 33 563 825 319
Adresa e-pošte: support@cepheideurope.com

Informacije za kontakt sa svim kancelarijama službe tehničke podrške kompanije Cepheid dostupne su na našem veb-sajtu:
www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Tabela simbola

Simbol	Značenje
	Kataloški broj
	<i>In vitro</i> dijagnostičko medicinsko sredstvo
	CE oznaka – Evropska usklađenost

Simbol	Značenje
	Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici
	Ne koristiti ponovo
	Serijski kod
	Pogledajte uputstvo za upotrebu
	Oprez
	Proizvođač
	Zemlja proizvodnje
	Sadrži dovoljno za n testova
	Kontrola
	Rok upotrebe
	Ograničenje temperature
	Biološki rizici
	Ovlašćeni predstavnik u Švajcarskoj
	Uvoznik



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France



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



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



24 Istorija revizija

Odeljak	Opis promene
Tabela simbola	Dodati simboli za CH REP i uvoznika i definicije u tabeli simbola. Dodate informacije o CH REP i uvozniku sa adresom u Švajcarskoj.
Istorija revizija	Tabela sa istorijom revizija je ažurirana.