

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Bruksanvisning

IVD CE

Varumärken, patent och copyright-uttalanden

Cepheid[®], Cepheid-logotypen, GeneXpert[®], och Xpert[®] är varumärken som tillhör Cepheid, registrerade i USA och andra länder.

Alla andra varumärken tillhör respektive ägare.

KÖPET AV DENNA PRODUKT ÖVERFÖR DEN ICKE-ÖVERFÖRBARA RÄTTIGHETEN TILL KÖPAREN ATT ANVÄNDA PRODUKTEN I ENLIGHET MED DENNA BRUKSANVISNING. INGA ANDRA RÄTTIGHETER ÄR UTTRYCKLIGEN ÖVERFÖRDA, UNDERFÖRSTÅDDA ELLER VIA ESTOPPEL. DESSUTOM MEDFÖLJER INGA RÄTTIGHETER FÖR ÅTERFÖRSÄLJNING VID KÖPET AV DENNA PRODUKT.

© 2017-2023 Cepheid.

Se Revisionshistorik, för en beskrivning av ändringar.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

In vitro-diagnostisk medicinteknisk produkt

1 Egendomsskyddat namn

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Allmänt namn

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 Avsedd användning

Xpert Breast Cancer STRAT4-test är en semikvantitativ assay baserat på polymeraskedjereaktion med kvalitativa cutoff-väden för östrogenreceptor (*ESR1*), progesteronreceptor (*PGR*), human epidermal tillväxtfaktorreceptor 2 (*ERBB2/HER2*) och markör för proliferation Ki-67 (*MKi67*) mRNAs isolerade från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) invasiv bröstcancervävnad. RNA extraheras från ett tumörberikat område av en mikroskopvävnadssektion som identifierats av en patolog. Testet ska användas i kombination med andra kliniska data och laboratoriedata för att klassificera bröstcancervävnader angående deras status för hormonreceptor, HER2-receptor och prolifereringsmarkör. Testet är avsett att användas med GeneXpert[®]-systemet, som inkluderar RNA-isolering från FFPE-vävnad, samt amplifiering och detektion av målsekvenser i kassetten.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testet är inte avsett som:

- En prediktor för sjukdomens svårighetsgrad
- En fristående enhet för diagnostisk testning av bröstcancer
- En prognostikator för sjukdomsåterfall

Indikationer för användning: Testet är avsett att användas för att bedöma mRNA-nivåerna av *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, och *MKi67* i invasiva bröstcancervävnader erhållna från patienter och beredda som FFPE-prover, och som ett hjälpmedel vid klinisk utvärdering i kombination med andra laboratoriedata.

4 Sammanfattning och förklaring

Bröstcancer är en av de vanligaste cancerformerna hos kvinnor världen över, med cirka 1,7 miljoner nya fall av bröstcancer varje år.¹ I Europa diagnostiseras cirka 494 000 nya fall varje år och 143 000 patienter kommer att dö av sin sjukdom. I USA diagnostiserades cirka 200 000 nya fall av invasiv bröstcancer 2015.² Bröstcancer är den vanligaste orsaken till dödlighet från cancer bland kvinnor i utvecklingsländer och den näst vanligaste orsaken till dödlighet från cancer (efter lungcancer) bland kvinnor i industriländer.²

Hos kvinnor är bröstcancer den vanligaste cancerdiagnosen och den främsta orsaken till dödsorsak från cancer.¹ Dödligheten för bröstcancer har minskat med 34 procent sedan 1990, främst på grund av förbättrad behandling och tidig detektion.³ Mätningar av uttryck av ER- och PR-protein är prognostiska för utfall av bröstcancer och de förutsår respons mot tamoxifen och andra hormonella terapier.^{4,5,6,7} HER2-överuttryck ger en negativ prognos hos kvinnor med bröstcancer; men ännu viktigare, respons mot trastuzumab eller andra HER2-riktade behandlingar förutses av HER2 (*ERBB2*) proteinöveruttryck eller HER2-genamplifiering.⁸ Markör för proliferation av Ki-67 (*MKi67*) har studerats i stor utsträckning i retrospektiva studier hos patienter med bröstcancer⁹ och anses vara en viktig indikator för behovet av kemoterapi.¹⁰ Meta-analyser har visat att det är förknippat med sämre överlevnadsresultat vid tidig bröstcancer.¹¹ Med tanke på dessa markörers

betydelse vid valet av en effektiv behandlingsregim för en patient med bröstcancer, rekommenderar behandlingsriktlinjer i European Society for Medical Oncology (ESMO) att alla primära bröstkarcinomer testas för ER, PR, HER2 (ERBB2) och Ki67 vid tidpunkten för diagnos.¹²

Immunhistokemi (IHC) används vanligtvis för mätning av ER, PR, HER2 och Ki67 proteinuttryck. För HER2-uttryck är IHC vanligtvis det första testet som utförs och resultaten rapporteras på en skala från 0 till 3+. Om resultatet är tvetydigt för HER2-uttryck (2+) ändras provet till en HER2 In situ-hybridiserings (ISH)-assay, såsom fluorescens in situ-hybridisering (FISH) eller kromogen in situ-hybridisering (CISH) som letar efter HER2-gen amplifiering.¹³ En hög grad av variation i resultat har visats för IHC och ISH jämfört mellan laboratorier, till stor del på grund av skillnader i antikropparna som används för IHC såväl som subjektivitet av tolkningsmetoder.¹⁴

Xpert Breast Cancer STRAT4-testet är ett in vitro-diagnostiskt test som används för att bestämma mRNA-uttrycksnivåerna för *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, och *MKi67* isolerade från FFPE-prover av invasiv bröstcanceravvävnad.

Assayen utförs i en fristående kassetten efter ett lysatberedningssteg off-board, vilket kräver mindre än 15 minuters hands-on-tid med en total tid på mindre än 2 timmar.

5 Metodens princip

Xpert Breast Cancer STRAT4-testet är en transkriptaspolymeraskedjereaktion (PCR)-assay i realtid för detektion av *ESR1*-, *PGR*-, *ERBB2*- och *MKi67*-mRNA-isolerade från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) invasiv bröstvävnad. Assayen utförs på Cepheid GeneXpert-instrumentsystemen. GeneXpert-instrumentsystemen automatiserar och integrerar provrening, nukleinsyraamplifiering och målsekvensdetektion i enkla eller komplexa prov med RT-PCR-assayer i realtid. Systemen består av ett instrument, en streckkodsscanner, en dator och förladdad programvara för att köra tester och visa resultaten. Systemen använder kasserbara kassetter för engångsbruk som rymmer RT-PCR-reagenserna och som står för RT-PCR-processen. För en fullständig beskrivning av systemen, se tillämplig användarmanual för GeneXpert instrumentsystem.

Xpert Breast Cancer STRAT4-testet inkluderar reagens för samtidig detektering av *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, en cytoplasmatisk FMR1-interagerande protein 1 (CYFIP1) referensgen, en intern RT-PCR-kontroll (CIC) och en intern probe check kontroll (PCC). Referensgenen verifierar provtillräcklighet och används för att normalisera mRNA-uttrycksnivåerna för *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* och *MKi67*. Den interna RT-PCR-kontrollen (CIC) används för att verifiera att RT-PCR-reaktionen fortsatte korrekt. PCC verifierar rehydrering av reagenskula, RT-PCR-rörets fyllning, probens integritet och färghållbarheten i kassetten. Totalt använder assayen sex distinkta fluorescerande kanaler för mål- eller kontroll/referensdetektering med sina egna cutoff-parametrar för mål-/kontroll/referensgiltighet.

FFPE-prover måste först behandlas med Xpert® FFPE Lysis Kit genom att bereda en 4-5 µm (mikron)-tjock vävnadssektion där FFPE-vävnaden först makrodissektas, om så krävs, för att berika invasivt tumörområde och sedan skrapas och placeras i ett rör tillsammans med de rekommenderade volymerna av FFPE-lysreagens och proteinas K. Lösningen inkuberas sedan i ett värmeblock vid 80 °C i 30 minuter. Etanol blandas sedan med provet och den rekommenderade volymen av det beredda provlysatet tillsätts sedan direkt i en testkassetten. Testkassetten sätts in i en modul i ett GeneXpert instrumentsystem där nukleinsyranering, amplifiering och realtidsdetektering är helt automatiserade och helt integrerade i systemet. Alla reagenser som krävs för beredning ombord och RT-PCR-analys är förinstallerade i kassetten. Nukleinsyror i lysatet fångas upp på ett filter, tvättas och elueras genom ultraljudsbehandling. Den reade nukleinsyran blandas därefter med torra RT-PCR-reagenser och lösningen överförs till reaktionsröret för RT-PCR och detektion. Tiden till resultat är cirka 75 minuter i GeneXpert.

Detekterings-cutoff som Xpert Breast Cancer STRAT4-testet använder i varje fluorescerande kanal fastställdes för att maximera positiva, negativa och övergripande procentuella överensstämmelser jämfört med referenslaboratoriets IHC- eller IHC/FISH-resultat för varje mål. IHC för ER, PR, Ki67 och HER2 samt FISH för HER2 bearbetades och betygsattes enligt instruktionerna i bruksanvisningen. Tolkningen av positiva -resultat slutfördes enligt ASCO/CAP 2013 riktlinjer.¹⁵ Tumörer klassificerades som ER- eller PR/IHC-positiva när $\geq 1\%$ av invasiva tumörceller visade bestämd nukleärfärgning, oavsett färgningsintensitet. HER2-uttryck utvärderades med HercepTest (IHC)-kitet (Dako) och fick betygsattes som 0, 1+, 2+ eller 3+. Tumörer som fick 2+ ändrades till HER2 FISH med hjälp av PathVysion HER2 DNA-probekit (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Fall ansågs HER2-positiva om de fick 3+ med IHC och/eller amplifierad med FISH (definierat som HER2:CEP17 (förhållande $\geq 2,0$) och/eller genomsnittligt HER2-kopieringsnummer $\geq 6,0$ signaler/cell enligt 2013 års ASCO/CAP riktlinjeuppdatering för klinisk praxis för HER2-testning vid bröstcancer.¹⁵ För Ki67 klassificerades tumörer som positiva (högt) när $\geq 20\%$ av invasiva tumörceller visade bestämd nukleärfärgning, oavsett färgningsintensitet.

När det gäller referensgenkontrollen och intern RT-PCR-kontroll definierar detektion-cutoff intervall för minsta och maximala cykeltröskel (Ct) PCR-värden som bestämmer ett giltigt resultat, en adekvat minsta provinmatning och ingen PCR-hämning. När det gäller målen *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* och *MKi67* definieras detektion-cutoff av delta-cykeltröskel (dCt) (referensgen Ct minus målgen Ct) värden som bestämmer POSITIVA (POSITIVE) kontra NEGATIVA (NEGATIVE) resultat för ett givet mål i en kanal.

6 Reagenser och instrument

6.1 Tillhandahållna material

Xpert Breast Cancer STRAT4-kitet innehåller tillräckligt med reagens för att bearbeta 10 kvalitetskontrollprover eller FFPE-lysat som är beredda med Xpert FFPE Lysis Kit (katalog# GXFFPE-LYSIS-CE-10). Xpert Breast Cancer STRAT4-kitet innehåller följande artiklar:

Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter med integrerade reaktionsrör	10
<ul style="list-style-type: none"> • Kula 1, 2 och 3 (frystorkade) • Sköljreagens, • Elueringsreagens, 	<ul style="list-style-type: none"> 1 per kasset 1,0 ml per kasset 2,0 ml per kasset
CD	1 per kit
<ul style="list-style-type: none"> • Assay Definition File (ADF) • Bruksanvisning • ONCore rapportfiler 	

Anm Säkerhetsdatabladet (SDS) finns tillgängliga på www.cepheid.com eller www.cepheidinternational.com under fliken **SUPPORT**.

Anm Bovint serumalbumin (BSA) i kulorna inuti denna produkt producerades och tillverkades enbart från bovin plasma insamlad i USA. Inget protein från idisslare eller annat djurprotein gavs till djuren. Djuren testades och godkändes före och efter döden. Under bearbetning blandades inte materialet ihop med andra djurmaterial.

7 Förvaring och hantering

- Förvara innehållet i Xpert Breast Cancer STRAT4-kitet vid 2–28 °C.
- Öppna inte ett kassetlock förrän du är klar att genomföra testningen.
- Använd kassetten inom 30 minuter efter öppnandet av kassetlocket.
- Använd inte en kasset som har läckt.

8 Nödvändiga material som inte tillhandahålls

- Xpert FFPE Lysis Kit (katalog# GXFFPE-LYSIS-CE-10) för beredning av FFPE-lysat. Kitet består av FFPE-lysreagens, proteinas K (PK), 1,5 ml rör och 5 ml ampuller.
- Vortexblandare.
- Pipetter och pipettspetsar med aerosolfilter lämpliga för att pipettera 600ul, 1,2 µl och 520 µl.
- Dator med proprietär GeneXpert-mjukvara version 4.7b eller senare eller Xpertise version 6.4b eller senare, streckkodsskanner och tillämplig användarmanual för GeneXpert-instrumentsystem.
- Skrivare: Om en skrivare behövs kan du kontakta Cepheid teknisk support för att ordna inköp av en rekommenderad skrivare.

9 Varningar och försiktighetsåtgärder

- Endast för *in vitro*-diagnostisk användning.
- Alla biologiska prov bör behandlas som om de kan överföra smittämnen. Alla humanprov ska behandlas med sedvanliga försiktighetsåtgärder. Riktlinjer för provhantering finns tillgängliga från Världshälsoorganisationen (World Health Organization) eller CDC (Center för sjukdomskontroll och prevention, Centers for Disease Control and Prevention) i USA.
- Följ din institutions säkerhetsmetoder vid arbete med kemikalier och hantering av biologiska prov.

- Prestanda och egenskaper för detta test har fastställts med de provtyper som listats i Avsnitt 3. Prestandan för denna assay med andra provtyper eller prov har inte utvärderats.
- FFPE-vävnad måste bearbetas med Xpert FFPE Lysis Kit (katalog # GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- Ofullständigt avlägsnande (skrapning) av tumörområdet från objektglaset för beredning av FFPE-lysatet kan resultera i otillräckligt material för assayen och därför en högre än förväntad obestämd/ogiltig hastighet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testet.
- Öppna inte Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetlocket förutom när du tillsätter förberett FFPE-lysat.
- Använd inte en kassett som tappats efter uttagandet ur förpackningen.
- Skaka inte kassetten. Om kassetten skakas eller tappas efter öppnandet av kassetlocket kan ogiltiga resultat erhållas.
- Använd inte en kassett som har ett skadat reaktionsrör.
- Varje Xpert Breast Cancer STRAT4-kassett för engångsbruk används för att bearbeta ett test. Återanvänd inte använda kassetter.
- Använd inte en kassett om den verkar våt eller om lockförseglingen verkar vara bruten.
- Placera inte provets ID-etikett på kassetlocket eller på streckkodsetiketten på kassetten.
- För att undvika kontaminering av prov eller reagenser rekommenderas god laboratoriesed, vilket inkluderar byte av handskar mellan hanteringar av patientprov.
- Kontakta din institutions miljöavdelning gällande korrekt avyttrande av använda kassetter och oanvända reagenser. Kontrollera statliga, territoriella eller lokala bestämmelser eftersom de kan skilja sig från nationella bestämmelser om bortskaffande. Materialet kan uppvisa egenskaper som farligt avfall och kräva specifika bortskaffningsförfaranden. Institutioner ska kontrollera sina respektive bestämmelser för avyttring av farligt avfall.

10 Kemiskt farliga ämnen^{16,17}

Enligt Globally Harmonized System for Classification and Labeling (GHS, globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier) anses det här materialet inte vara farligt.

11 Provinsamling, transport och förvaring

- Använd endast med FFPE-prover som behandlats med Xpert FFPE Lysis Kit (katalog # GXFFPE-LYSIS-CE-10). Följ ASCO/CAP-riktlinjerna¹⁵ för beredning av FFPE-vävnad.
- FFPE-lysat bör beredas från FFPE-tumörblocket med det största området av livskraftigt bröstkarinom (minst 30 % cellularitet av tumör) och manuell makrodissektion bör utföras, om det behövs, innan test i Xpert Breast Cancer STRAT4-testet. För tumörprover mindre än 10 mm² med mindre än 30 % tumör kan användning av den koncentrerade lysatmetoden eller mer än en 4-5 µm sektion krävas för giltiga resultat.
- FFPE-lysat ska transporteras till laboratoriet vid 2–8 ° C.
- FFPE-lysat är stabilt upp till 1 vecka vid 2–8 ° C eller 4 veckor vid ≤ -20 ° C före test med Xpert Breast Cancer STRAT4. Förvaras vid -80 ° C för långvarig förvaring. Högst 1 frys-tining rekommenderas. När du tinar, tina till rumstemperatur och vortexa FFPE-lysat i 15 sekunder före användning.

12 Metod

Viktigt Användning av Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetten kräver förberedelse av ett lysat med Xpert FFPE Lysis Kit (katalog # GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Viktigt Starta assayen inom 30 minuter från det att det förberedda provet tillsatts till kassetten.

12.1 Förbereder FFPE-lysat

Förbered FFPE-lysat i enlighet med bruksanvisningen för FFPE-lysiskit.

12.2 Förbereda kassetten

1. Ta ut kassetten ur pappförpackningen.
2. Vortexa beredd FFPE-lysat 15 sekunder före användning.

3. Öppna kassetten lock.
 4. Använd en pipett för att överföra 520 µl FFPE-lysat till kassetten provkammare. (Obs: en liten mängd fällning kan förekomma, vilket inte påverkar assayens prestanda).
- Behåll kvarvarande FFPE-lysat vid 2–8 °C eller ≤ –20 °C i fall av omprövning.



Figur 1. Xpert Breast Cancer STRAT4-kaset (vy ovanifrån)

5. Stäng locket på kassetten. Säkerställ att locket snäpper stadigt på plats.

12.3 Starta testet

Viktigt Innan du startar testet ska du försäkra dig om att Xpert Breast Cancer STRAT4 assay definition file (ADF) har importerats in i mjukvaran.

Detta avsnitt listar standardstegen för att använda GeneXpert-systemet. För detaljerade anvisningar, se *GeneXpert Dx-systemets användarmanual* eller *GeneXpert Infinity-systemets användarmanual*, beroende på vilket instrument som används.

Anm De steg som du följer kan skilja sig åt om systemadministratören har ändrat systemets standardarbetsflöde.

1. Sätt på GeneXpert-instrumentet:
 - Om du använder GeneXpert Dx-instrumentet, sätt först på GeneXpert-instrumentet och sedan datorn. GeneXpert-mjukvaran startar automatiskt eller kan kräva en dubbelklickning på GeneXpert Dx-mjukvarans ikon på Windows®-skrivbordet.
 - eller
 - Om du använder GeneXpert Infinity-instrumentet, starta instrumentet. Xpertise-mjukvaran startar automatiskt eller kan kräva en dubbelklickning på Xpertise-mjukvarans ikon på Windows-arbetsbordet.
2. Logga in på GeneXpert-instrumentsystemets mjukvara med användning av ditt användarnamn och lösenord. I GeneXpert-systemfönstret, klicka på **Skapa test (Create Test)** (GeneXpert Dx) eller klicka på **Beställningar (Orders)** och **Beställa test (Order Test)** (Infinity). Fönstret Skapa test (Create Test) öppnas.
3. Skanna eller skriv in Prov-ID (Sample ID). Om du skriver in Prov-ID (Sample ID), se till att du skriver in det rätt. Prov-ID (Sample ID) associeras med testresultaten och visas i fönstret Granska resultat (View Results) och alla rapporter. Dialogrutan Skanna kassetten (Scan Cartridge) visas.
4. Skanna streckkoden på Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetten. Fönstret Skapa test (Create Test) visas. Mjukvaran fyller automatiskt i rutorna i de följande fälten med hjälp av streckkodsinformation: Välj assay (Select Assay), reagenslot-ID (Reagent Lot ID), kassetten serienummer (Cartridge SN).
5. Klicka på **Starta test (Start Test)** (GeneXpert Dx) eller **Skicka in (Submit)** (Infinity). Skriv in lösenordet om det begärs.
6. För GeneXpert Dx-instrumentet:
 - a) Öppna instrumentmodulens dörr med den blinkande gröna lampan och ladda kassetten.
 - b) Stäng dörren. Testet startas och den gröna lampan slutar att blinka. När testet är klart slutar lampan att lysa.
 - c) Vänta tills systemet frigör dörregeln innan du öppnar moduldörren. Ta ut kassetten.
 - d) Kassera använda kassetter i lämpliga avfallsbehållare för prov enligt din institutions standardpraxis. Se Avsnitt 9.

eller

För GeneXpert Infinity-systemet ska kassetten placeras på transportbandet. Kassetten kommer automatiskt att laddas, testen kommer att köras och den använda kassetten kommer att placeras i avfallsbehållaren.

13 Granska och skriva ut resultat

Detta avsnitt anger de grundläggande stegen för att granska och skriva ut resultat. För mer detaljerade anvisningar om hur man granskar och skriver ut resultat, se *GeneXpert Dx-systemets användarmanual*, eller *GeneXpert Infinity-systemets användarmanual*, beroende på vilket instrument som används.

1. Klicka på **Granska resultat (View Results)** ikonen för att granska resultat (View Results).
2. När testet är klart, klicka på **Rapport (Report)** knappen på Granska resultat (View Results) för att visa och/eller generera en rapportfil i PDF-format.

Anm

Om du använder ONCore-mjukvara för att generera en rapport hänvisar vi till GeneXpert ONCore-användarhandboken för mjukvara på CD-skivan för ONCore-användarhandboken för instruktioner om hur du skapar en rapport. Se även instruktionerna för ONCore-rapporten på Xpert Breast Cancer STRAT4 CDn för instruktioner om hur du tolkar ONCore-rapporten för Xpert Breast Cancer STRAT4-testet.

14 Kvalitetskontroll

Varje test innehåller en referensgenkontroll (*CYFIP1*) och en probe check kontroll (PCC).

- **CYFIP1 kontroll:** Denna referensgen används för att normalisera uttrycksnivåerna för *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, och *MKI67*. Det fungerar också som en SAC (Sample Adequacy Control, adekvat provkontroll) för att säkerställa att provet innehåller tillräckligt med RNA. En minsta *CYFIP1*-signal krävs för ett giltigt testresultat. En *CYFIP1*-signal under minsta mängden eller en negativ signal indikerar att provet inte innehåller tillräckligt med RNA.
- **CYFIP1 -alternativ:** Detta är en duplicerad *CYFIP1*-kontroll som används i algoritmen när delta-cykeltröskel (dCt) för *PGR* eller *MKI67* ligger under cutoff-inställningarna för assayen. För dessa mål krävs ytterligare en minsta *CYFIP1*-alternativsignal för att säkerställa ett giltigt testresultat.
- **Probe check kontroll (PCC):** Före start av PCR mäter GeneXpert-instrumentsystemet fluorescenssignalen från proberna för att övervaka rehydreringen av kulan, fyllningen av reaktionsröret, probeintegriteten och färgstabiliteten. PCC godkänns om den uppfyller de validerade acceptanskriterierna.
- **Externa kontroller (inte tillhandahållna):** Externa kontroller ska användas i enlighet med lokala, statliga och federala godkända organisationers krav, som tillämpligt.

15 Tolkning av resultat

Resultaten tolkas automatiskt av GeneXpert-instrumentsystemet från uppmätta fluorescenssignaler, och inbäddade beräkningsalgoritmer och visas tydligt i fönstret Granska resultat (View Results) i flikarna Testresultat (Test Results) och Analytresultat (Analyte Result). Testresultaten (Test results) och Analytresultaten (Analyte Results) visas även i Testrapporten (Test Report). Möjliga resultat visas i Tabell 1 and Tabell 2.

Tabell 1. Alla möjliga resultat för Xpert Breast Cancer STRAT4-testet

Visade resultat	CYFIP1	CYFIP1-alternativ	CIC
<i>ESR1</i> POSITIV (<i>ESR1</i> POSITIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>ESR1</i> NEGATIV (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>PGR</i> POSITIV (<i>PGR</i> POSITIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>PGR</i> NEGATIV (<i>PGR</i> NEGATIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS	POS eller NEG

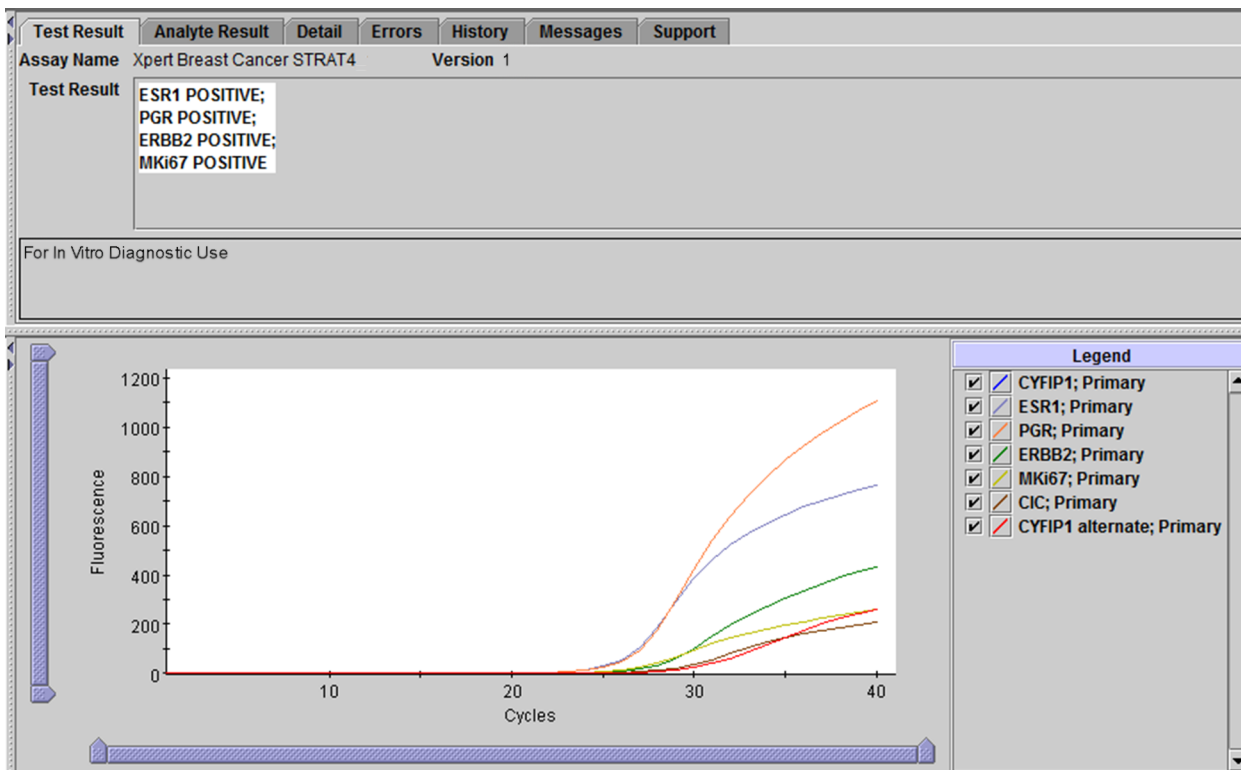
Visade resultat	CYFIP1	CYFIP1-alternativ	CIC
<i>ERBB2</i> POSITIV (ERBB2 POSITIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>ERBB2</i> NEGATIV (ERBB2 NEGATIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>MKi67</i> POSITIV (MKi67 POSITIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	POS eller NEG
<i>MKi67</i> NEGATIV (MKi67 NEGATIVE)	GODKÄNT (PASS)	POS	POS eller NEG
<i>PGR</i> OBESTÄMT (PGR INDETERMINATE)	GODKÄNT (PASS)	NEG	POS eller NEG
<i>MKi67</i> OBESÄMT (MKi67 INDETERMINATE)	GODKÄNT (PASS)	NEG	POS eller NEG
UPPREPA TEST (REPEAT TEST)	GODKÄNT (PASS)	POS eller NEG	NEG
OGILTIGT (INVALID)	EJ GODKÄNT (FAIL)	NEG	POS eller NEG
FEL (ERROR)	INGET RESULTAT (NO RESULT)	INGET RESULTAT (NO RESULT)	INGET RESULTAT (NO RESULT)
INGET RESULTAT (NO RESULT)	INGET RESULTAT (NO RESULT)	INGET RESULTAT (NO RESULT)	INGET RESULTAT (NO RESULT)

Tabell 2. Xpert Breast Cancer STRAT4 representativa resultat och tolkning

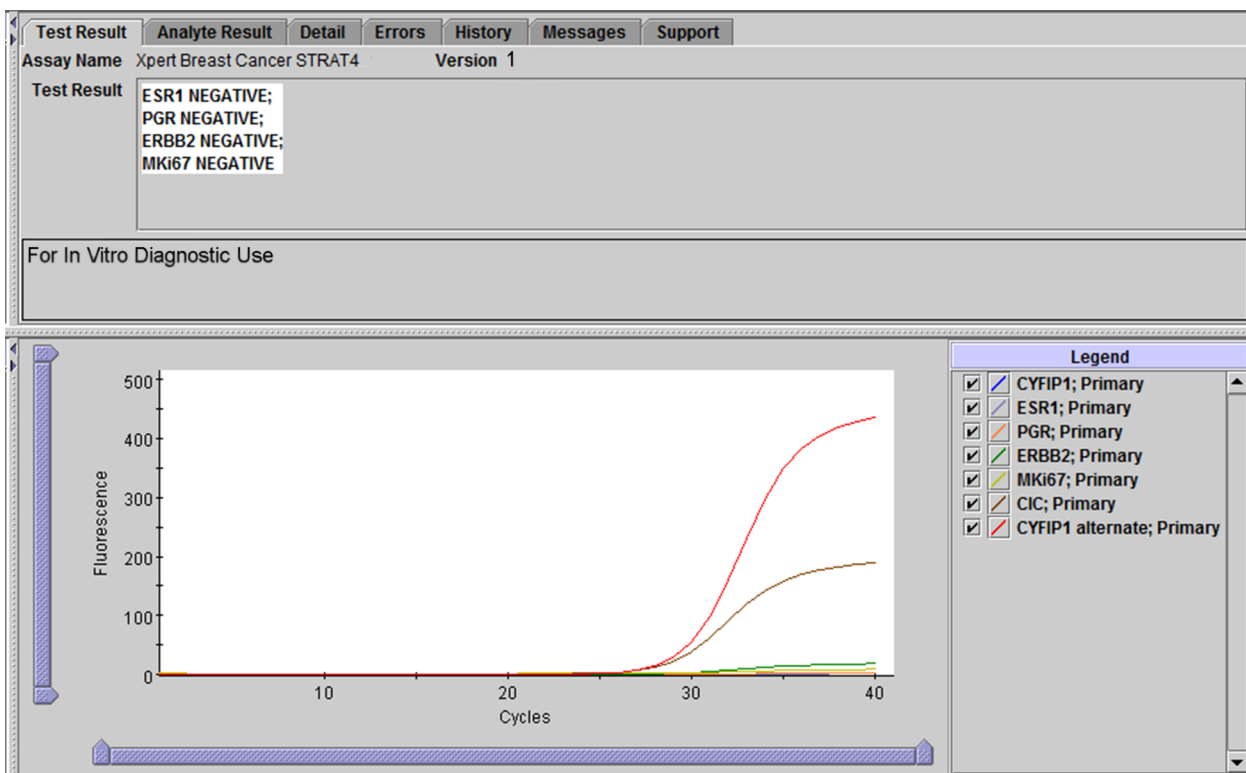
Resultat	Tolkning
<p>ESR1 POSITIV (ESR1 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i> mRNA-transkript är överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) ovanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>PGR POSITIV (PGR POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> mRNA-transkript är överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) ovanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>ERBB2 POSITIV (ERBB2 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i> mRNA-transkript är överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) ovanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>MKi67 POSITIV (MKI67 POSITIVE)</p> <p>Se Figur 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> mRNA-transkript är överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) ovanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>ESR1 NEGATIV (ESR1 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1</i> mRNA-transkript är inte överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) nedanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>PGR NEGATIV (PGR NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> mRNA-transkript är inte överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) nedanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.

Resultat	Tolkning
<p>ERBB2 NEGATIV (ERBB2 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ERBB2</i> mRNA-transkript är inte överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) nedanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>MKi67 NEGATIV (MKi67 NEGATIVE)</p> <p>Se Figur 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> mRNA-transkript är inte överuttryckt och har en delta-cykeltröskel (dCt) nedanför cutoff-inställningarna. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – POS; <i>CYFIP1</i> har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>PGR Obestämt (PGR Indeterminate)</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PGR</i> mRNA-uttrycksnivå kan inte bestämmas på grund av att provet innehåller otillräckligt material. Upprepa testet med mer koncentrerat lysat. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i> cykeltröskel (Ct) var inte inom giltigt intervall eller var slutpunkt under den nödvändiga tröskelinställningen som krävs för PGR-statusbestämning. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>MKi67 Obestämt (MKi67 Indeterminate)</p> <p>Se Figur 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MKi67</i> mRNA-uttrycksnivå kan inte bestämmas på grund av att provet innehåller otillräckligt material. Upprepa testet med mer koncentrerat lysat. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i> cykeltröskel (Ct) var inte inom giltigt intervall eller var slutpunkt under den nödvändiga tröskelinställningen som krävs för MKi67-statusbestämning. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
<p>UPPREPA TEST (REPEAT TEST)</p> <p>Se Figur 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> mRNA-uttrycksnivåer kan inte bestämmas. Upprepa testet med en aliquot av kvarvarande FFPE-provlysat. • <i>CYFIP1</i> – GODKÄNT (PASS); <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript har detekterats och har en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och en slutpunkt över tröskelinställningen. • <i>CYFIP1</i> alternativ – POS/NEG; <i>CYFIP1</i> mRNA-transkript detekterades. Transkriptet kan ha eller inte ha en cykeltröskel (Ct) inom giltigt intervall och slutpunkt över tröskelinställning. • CIC – NEG; intern kontroll har en cykeltröskel (Ct) utanför giltigt intervall. • Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.

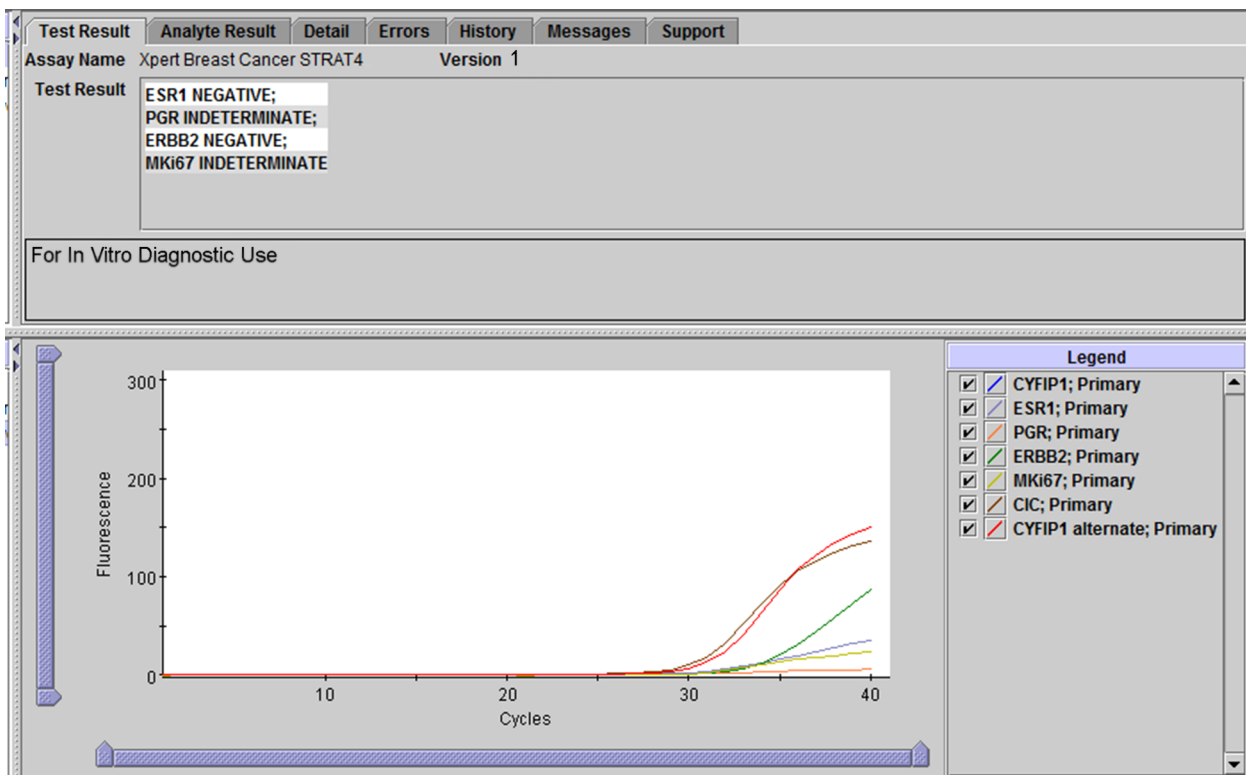
Resultat	Tolkning
OGILTIGT (INVALID)	<ul style="list-style-type: none"> OGILTIGT (INVALID) – <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> mRNA-uttrycksnivå kan inte bestämmas på grund av att provet innehåller otillräckligt material. Upprepa testet med mer koncentrerat lysat. <i>CYFIP1</i> – EJ GODKÄNT (FAIL) – <i>CYFIP1</i>-cykeltröskeln (Ct) låg inte inom giltigt intervall eller slutpunkten låg under tröskelinställningen. <i>CYFIP1</i> alternativ – NEG; <i>CYFIP1</i> -cykeltröskeln (Ct) låg inte inom giltigt intervall eller slutpunkten låg under tröskelinställningen. Probekontroll – GODKÄNT (PASS), alla probekontrollresultat är godkända.
FEL (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> mRNA-uttrycksnivåer kan inte bestämmas. Upprepa testet med en aliquot av kvarvarande FFPE-provlysat. <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INGET RESULTAT (NO RESULT) <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativ – INGET RESULTAT (NO RESULT) Probecheck – GODKÄNT (PASS)*/EJ GODKÄNT (FAIL); alla eller ett av probekontrollresultaten är ej godkända. <p>* Om probekontrollen är godkänd, orsakades felet av att den maximala tryckgränsen överskred det acceptabla intervallet, ett fel med kurvanpassning eller av ett fel på en systemkomponent.</p>
INGET RESULTAT (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> mRNA-uttrycksnivåer kan inte bestämmas. Otillräckligt med data har samlats in för att ett testresultat ska kunna produceras. Till exempel kan detta hända när användaren stoppade ett test som kördes. Upprepa testet med kvarvarande FFPE-provlysat. <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – INGET RESULTAT (NO RESULT) <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativ – INGET RESULTAT (NO RESULT) Probekontroll – Ej tillämpligt (NA, not applicable)



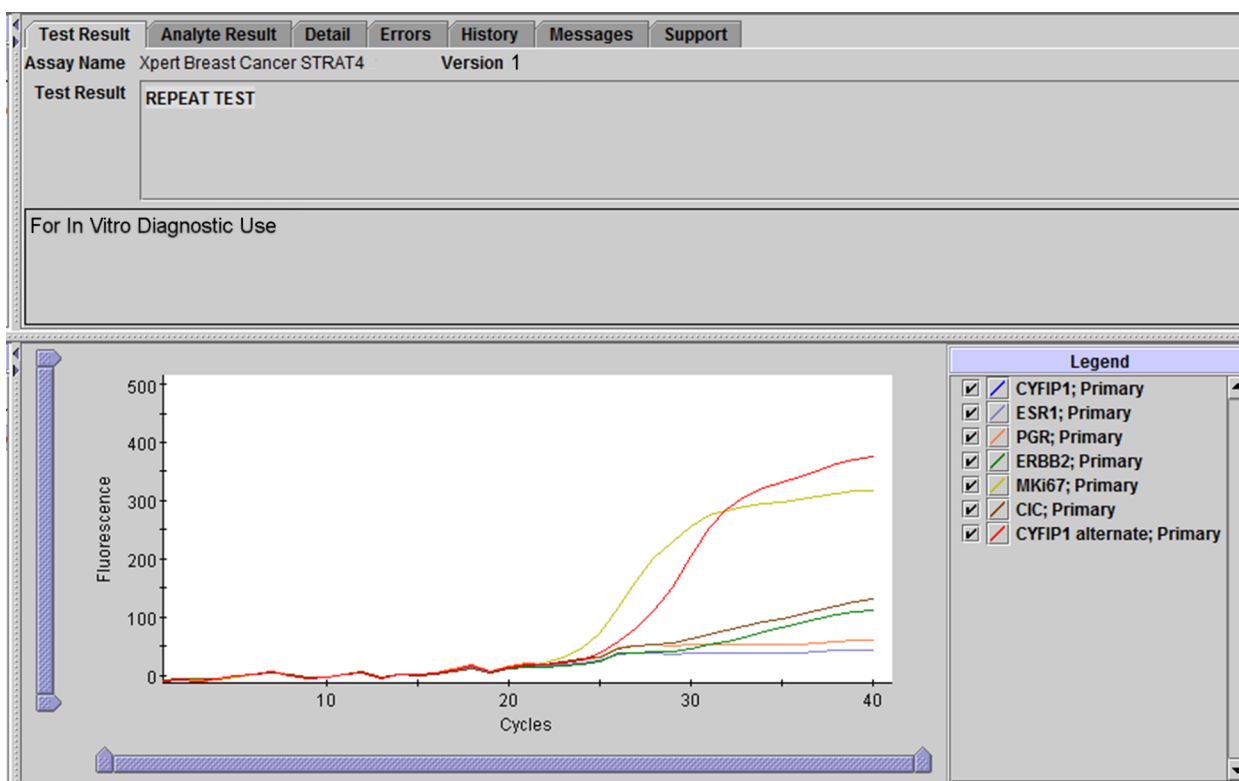
Figur 2. Fönstret Granska resultat (View Results) i GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIV



Figur 3. Fönstret Granska resultat (View Results) i GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIV



Figur 4. Fönstret Granska resultat (View Results) i GeneXpert Dx: PGR/MKi67 OBESTÄMT



Figur 5. Fönstret Granska resultat (View Results) i GeneXpert Dx: UPPREPA TEST (REPEAT TEST)

16 Anledningar till att upprepa testet

Upprepa testningen med en ny kassett (återanvänd inte kassetten).

- Resultatet **UPPREPA TEST (REPEAT TEST)** tyder på att den interna kontrollen misslyckades. Provet bearbetades inte korrekt. I detta fall upprepar du testet med en ny 520 µl alikvot av samma FFPE-lysat.
- Resultatet **OGILTIGT (INVALID)** anger att referenskontrollen misslyckades. Provet bearbetades inte korrekt, PCR inhiberades eller så var RNA-kvaliteten i den åtkomna tumören otillräcklig. I detta fall upprepar du testet med ett mer koncentrerat FFPE-lysat per instruktioner i bruksanvisningen för FFPE Lysis Kit.
- Ett **FEL (ERROR)**-resultat anger att probe check kontrollen misslyckades och analysen avbröts möjligen på grund av att ett reaktionsrör inte fyllts korrekt, ett integritetsproblem med reagensproben detekterades eller att maximala tryckgränserna överskreds, eller ett ventilpositioneringsfel detekterades. I detta fall upprepar du testet med en ny 520 µl alikvot av samma FFPE-lysat.
- Ett **INGET RESULTAT (NO RESULT)** tyder på att otillräckligt med data insamlades. Användaren stoppade till exempel ett pågående test eller ett strömavbrott uppstod. I detta fall upprepar du testet med en ny 520 µl alikvot av samma FFPE-lysat.
- Om en extern QC inte fungerar som förväntat, upprepa det externa kontrolltestet och/eller kontakta Cepheid för hjälp.

17 Begränsningar

- Modifiering av dessa metoder kan ändra testens prestanda. Resultat från Xpert Breast Cancer STRAT4 ska tolkas tillsammans med andra laboratorieresultat och kliniska uppgifter som är tillgängliga för klinikern.
- Prestanda för Xpert Breast Cancer STRAT4 validerades enligt procedurerna i denna bruksanvisning och med FFPE-prover som var fem till tio år gamla.
- Prestandan hos Xpert Breast Cancer STRAT4 validerades endast med användning av metoderna i denna bruksanvisning.

- Felaktiga testresultat kan uppstå vid olämplig provinsamling, hantering, förvaring eller vid förväxling av prov. Noggrann följsamhet av instruktionerna i denna bruksanvisning är nödvändig för att undvika felaktiga resultat.
- Prestanda och egenskaper har inte fastställts för patienter yngre än 25 års ålder.
- Mutationer eller polymorfismer i primär- eller probindningsregioner kan resultera i felaktiga men trovärdiga resultat för *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, och *MKi67*.

18 Prestanda och egenskaper

18.1 Klinisk prestanda

Prestanda och egenskaper för Xpert Breast Cancer STRAT4-testet utvärderades jämfört med IHC-resultat för ER, PR, HER2, och Ki67 och till fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) för HER2-genamplifiering på platser i USA och EU. Inledningsvis registrerades totalt 211 återstående avidentifierade FFPE-prover av primära invasiva bröstcancertumörer från USA och EU i denna studie. Tio (10) prover exkluderades på grund av att otillräcklig tumör var tillgänglig för testning, och ett prov exkluderades på grund av indraget samtycke. Således var totalt 200 prover tillgängliga för inkludering i dataanalyserna. För varje FFPE-prov bereddes flera objektglas för testning av Xpert; för IHC-testning av ER, PR, HER2 och Ki67; och för FISH-testning av HER2-genamplifiering.

Sammantaget gav Xpert Breast Cancer STRAT4 giltiga resultat vid det första testförsöket för 99,5 % (199/200) av studieproverna. Ett prov som först gav ett obestämt resultat (**FEL (ERROR)**, (**OGILTIGT**) **INVALID** eller **INGET RESULTAT (NO RESULT)**) gav senare ett testresultat efter ett enda omprov. Assayens totala lyckandefrekvens var 100,0 % (200/200).

Av de 200 proverna med giltiga Xpert-testresultat gav ESR1 och ERBB2 ett giltigt positivt eller negativt testresultat 100 % av tiden (200/200). För PGR och MKi67 gav Xpert ett giltigt positivt eller negativt testresultat i 98,5 % (197/200) respektive 97,0 % (194/200) av fallen. De 7 proverna med Xpert obestämda resultat för PGR och/eller MKi67 testades på nytt med den koncentrerade FFPE-lysatsmetoden. Både det ursprungliga (första försöket) och omprövningsresultaten visas i Tabell 3.

För hela datasetet, inklusive omprövningsresultaten, visade Xpert Breast Cancer STRAT4 en positiv procentuell överensstämmelse (PPA) på 97,2 %, en negativ procentuell överensstämmelse (NPA) på 95,0 % och en övergripande procentuell överensstämmelse (OPA) på 97,0 % för ESR1 i förhållande till IHC;¹⁸ PPA på 88,4 %, NPA på 90,7 % och OPA på 88,9 % för PGR i förhållande till IHC;¹⁸ PPA på 100,0 %, NPA på 92,4 % och OPA på 93,3 % för ERBB2 i förhållande till IHC;¹⁹ och PPA på 100 %, NPA på 92,0 % och OPA på 93,3 % för ERBB2 i förhållande till HER2 FISH.¹⁹ För MKi67 en PPA på 88,8 %, NPA på 100 % och OPA på 90,7 % med IHC-tröskelnivå inställd på >20 % för positivt och <10% för negativt. MKi67 IHC intermediära prover (10–20 % tröskelnivå, inberäknad) uteslöts från analysen. De övergripande PPA, NPA och OPA för varje mål visas i Tabell 3.

Tabell 3. Klinisk prestanda

Jämförande	Dataset ^a	Totalt (n) ^b	PPA	95 % KI	NPA	95 % KI	OPA	95 % KI
ESR1/ER Xpert kontra IHC	Ursprunglig	199	97,2 % (174/179)	93,6–98,8	100 % (20/20)	83,9–100	97,5 % (194/199)	94,3–98,9
	Omtestning	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	Ursprunglig	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
	Omtestning	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	Ursprunglig	180	100 % (22/22)	85,1–100	92,4 % (146/158)	87,2–95,6	93,3 % (168/180)	88,7–96,1
	Omtestning	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	Ursprunglig	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1
	Omtestning	178	100 % (28/28)	87,9–100	92,0 % (138/150)	86,5–95,4	93,3 % (166/178)	88,6–96,1

Jämförande	Dataset ^a	Totalt (n) ^b	PPA	95 % KI	NPA	95 % KI	OPA	95 % KI
ERBB2/HER2	Ursprunglig	197	100 % (27/27)	87,5–100	91,2 % (155/170)	86,0–94,6	92,4 % (182/197)	87,8–95,3
	Xpert kontra IHC + FISH	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	Ursprunglig	148	88,7 % (110/124)	81,9–93,2	100 % (24/24)	86,2–100	90,5 % (134/148)	84,7–94,3
	Xpert kontra IHC	151	88,8 % (111/125)	82,1–93,2	100 % (26/26)	87,1–100	90,7 % (137/151)	85,0–94,4

^a Ursprunglig = 1X lysat enligt instruktionerna i bruksanvisningen; Omprövning = omprövningsresultat på ett 4X koncentrerat lysat i fall där det ursprungliga provet (1X lysat) gav ett obestämt resultat för PGR och/eller MKi67.

^b Prover med obestämda eller icke-bestämda Xpert-resultat, prov med tvetydigt eller intermediärt IHC-resultat, prover med misslyckad IHC och misslyckad FISH exkluderas.

19 Analytisk prestanda

19.1 Analytisk sensitivitet/minsta assay-inmatning

Minsta assay-inmatning bestämdes genom att bedöma den maximala CYFIP1 Ct (referensgen) som exakt bestämmer den provinmatning som behövs för robust prestanda as assay. Denna provinmatning säkerställer att giltiga resultat erhålls i de flesta kliniska FFPE-prov som testats. Prov med ett värde av CYFIP1 Ct som är större än tillåtet kommer att generera ett **OGILTIGT (INVALID)** resultat.

Den analytiska sensitiviteten/minsta assay-inmatningen för Xpert Breast Cancer STRAT4-test definierade som maximum CYFIP1 Ct som resulterar i $\geq 95\%$ giltiga resultat, fastställdes med hjälp av spädningar av kliniska FFPE-provlysat för att utmana CYFIP1 Ct. För att bedöma sensitiviteten för CYFIP1 Ct spädades ett kliniskt FFPE-provlysat i serier och testades med N=20 replikat för varje spädningsnivå över 3 dagar tills $\leq 95\%$ av testresultaten var giltiga. Spädningsnivåerna inkluderade ett prov vid den förväntade minsta assay-inmatningen, två nivåer under det och två nivåer ovan. Testning utfördes på två loter av Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter.

Innan studien inleddes utfördes gränsen för blankprovning med N = 60 replikat med två oberoende loter av Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter. Gränsen för blankt prov bestod av en tom paraffinsektion (inget vävnadsprov), och alla testresultat visade förväntat OGILTIGT (**OGILTIGT (INVALID)**) resultatupprop. Seriespädningar av den kliniska provinmatningen av FFPE-vävnad vid 1/1000 gav 20/20 giltiga CYFIP1 Ct-värden med medelvärde Ct = 33,4 och 0,6 standardavvikelse (SD) från lot 1 i Xpert Breast Cancer STRAT4-test och medelvärde Ct = 33,6 och 0,5 standardavvikelse (SD) från lot 2. Ytterligare spädningar med senare CYFIP1 Ct-värden uppfyllde inte de giltiga resultaten med $\geq 95\%$ som krävs för studien. Tabell 4 sammanfattar antalet giltiga testkörningar vid varje serieutspädd provinmatning som relativ spädning eller som ett medelvärde för CYFIP1 Ct. Den analytiska sensitiviteten med två loter av Xpert Breast Cancer STRAT4-testkassetter visade minsta krav för assay-inmatning för CYFIP1 Ct = 33,4. Detta värde i kombination med assay-variansitet skulle möjliggöra att den övre CYFIP1 Ct = 35-gränsen ställs in för Xpert Breast Cancer STRAT4-testet.

Tabell 4. Minsta assay-inmatning i Xpert Breast Cancer STRAT4

Kitlot	Provinmatning (relativ spädning)	Medelvärde CYFIP1 Ct	Standardavvikelse (SD)	N giltig körning (Ct \leq 35)
00801 (Lot 1)	1/20	27,6	0,4	20/20
	1/100	29,8	0,3	20/20
	1/1 000	33,4	0,6	20/20
	1/2 000	34,2	0,5	9/20
	1/4 000	34,5	0,5	2/20
	NTC (ingen mallkontroll)	Ej tillämplig	Ej tillämplig	0/20
00903 (Lot 2)	1/20	27,8	0,3	20/20

Kitlot	Provinmatning (relativ spädning)	Medelvärde CYFIP1 Ct	Standardavvikelse (SD)	N giltig körning (Ct ≤ 35)
	1/100	30,0	0,3	20/20
	1/1 000	33,6	0,5	20/20
	1/2 000	34,2	0,4	9/20
	1/4 000	34,6	0,0	1/20
	NTC (ingen mallkontroll)	Ej tillämplig	Ej tillämplig	0/20

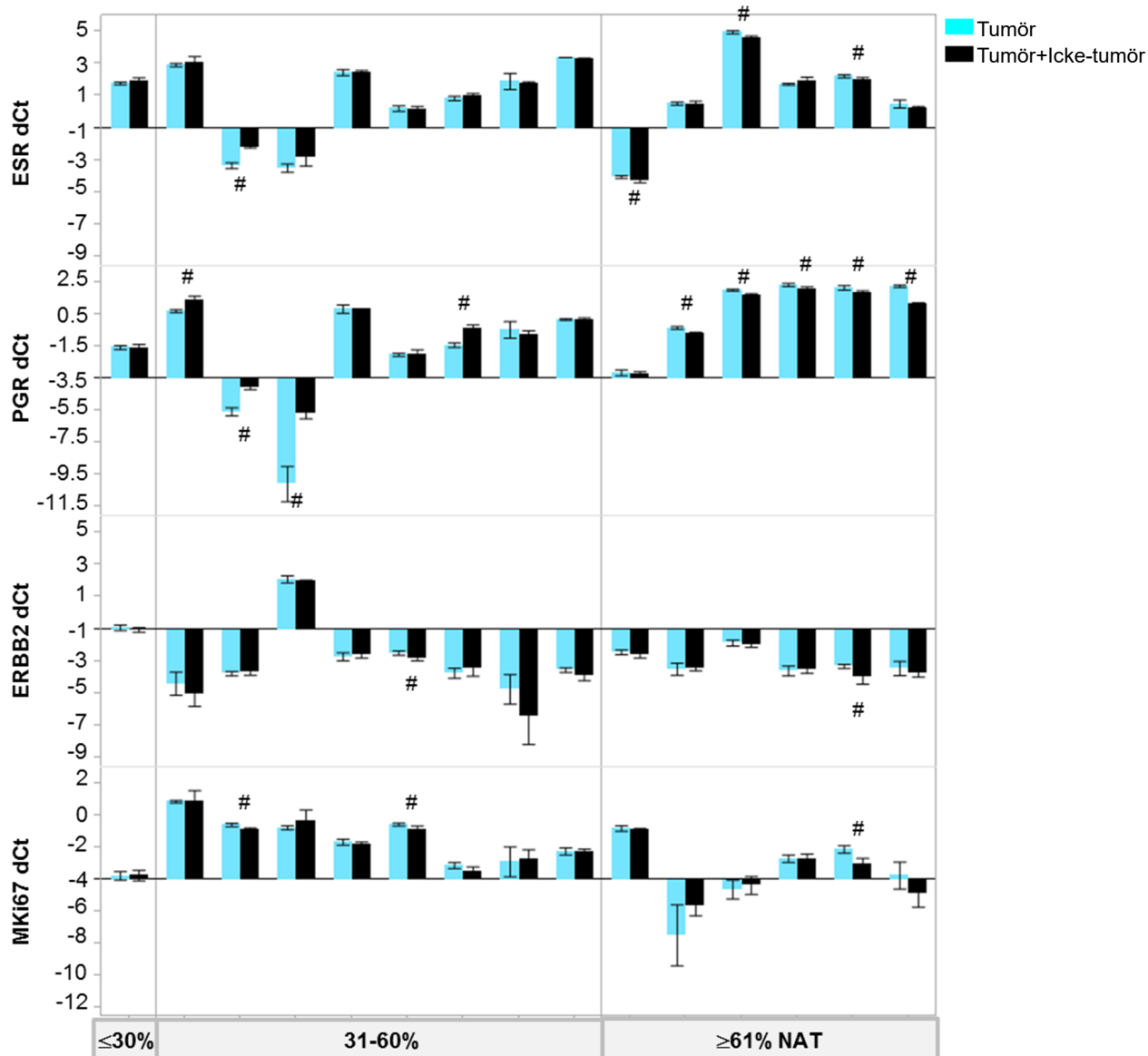
19.2 Interferens-testning

Intelligande normal/icke-tumör vävnad

Intelligande normal (icke-tumör) vävnad (NAT, normal adjacent tissue, intelligande normal vävnad) förekommer ofta bland bröstcancer vävnadsprover som föroreningar som potentiellt skapar interferens med specifik måldetektion. Xpert Breast Cancer STRAT4-testet kan kräva att en patologiskt verifierad FFPE-sektion för brösttumör makrodissektas för att minimera potentiella effekter av icke-tumörföroreningar i tillämpliga fall som bestämts av en patolog. För att bedöma effekten från intelligande normal/icke-tumör vävnad testades femton (15) FFPE-vävnadsblock med invasiv bröstcancer innehållande 21-98 % omgivande NAT med Xpert Breast Cancer STRAT4-testet med och utan makrodissektion. Xpert Breast Cancer STRAT4-testning utfördes med N = 4 replikat från samma lysat per tillstånd. ESR1, PGR, ERBB2 och MKi67 dCt-värden för varje vävnadsprov med makrodissektion (stapeldiagram i blått) eller utan makrodissektion (stapeldiagram i svart) utvärderades först via one-way ANOVA för att bestämma statistisk interferens av NAT. Kliniskt signifikant interferens av NAT ansågs förekomma när ddCt (delta-delta Ct) mellan makro- och icke-makrodissektade prover var > 1,0 och det uppstod en förändring av testresultatet. Studieresultaten sammanfattas i Figur 6.

ESR1, PGR, ERBB2 och MKi67 dCt-värden av alla 15 prover grupperades baserat på % NAT (≤ 30 %, 31-60 % eller ≥ 61 %). Blå och svarta vertikala stapeldiagram med standardavvikelse (SD) representerar genomsnittliga mål-dCt-värden från N = 4 replikat av makro- och icke-makrodissektade FFPE-sektioner i ett FFPE-invasivt bröstcancerblock. Alla 15 FFPE-block (N = 1 under 30 % NAT, N = 8 med 31-60 % NAT och N = 6 över 60 % NAT) visade antingen ingen statistisk signifikans av intelligande normal/ icke-tumör vävnadsinterferens baserad på one-way ANOVA-analyser med p-värde ≥ 0,05; eller ingen klinisk signifikans (markerat som #) om variationen i delta Ct-värden för varje mål mellan makrodissektade eller icke-makrodissektade prover var ≤ 1,0 eller när målttestresultaten (positiva, negativa) förblev opåverkade.

Figur 6. Intelligande normal/icke-tumör vävnadinterferens till Xpert Breast Cancer STRAT4 mål dCt-värden



DCIS, nekrotisk, hemorragisk vävnad

För att bedöma effekten av ductalt karcinom in situ (DCIS), nekrotiska och hemorragiska vävnader, testades totalt 9 FFPE-brösttumörprover (3 FFPE-brösttumörblock innehållande 3-61 % DCIS, 3 FFPE-block innehållande 10-65 % nekrotisk vävnad och 3 FFPE-block innehållande 15-41 % hemorragisk vävnad) med Xpert Breast Cancer STRAT4-testet, med och utan makrodissektion. Xpert Breast Cancer STRAT4-test utfördes med N = 4 replikat från samma lysat per tillstånd. Alla testförhållanden befanns ha antingen ingen statistisk eller ingen kliniskt signifikant inverkan från varierande DCIS, nekros och hemorragisk vävnadsföreningar med Xpert Breast Cancer STRAT4-testet (grafiska data visas inte).

Humant genomiskt DNA (hgDNA)

Xpert Breast Cancer STRAT4-testet använder mycket specifika primrar och prober för att effektivt hybridisera med mål-ESR1-, PGR-, ERBB2- och MKI67-mRNA-mallarna från en pool av genomiska nukleinsyror (humant genomiskt DNA = hgDNA). För att bedöma effekten av hgDNA på Xpert Breast Cancer STRAT4-testet makrodissekerades och testades 10 FFPE-brösttumörblock med varierande cellinnehåll av ductalt karcinom i bröst med och utan tillsats av 25 ng av hgDNA till FFPE-provlysatet med Xpert Breast Cancer STRAT4-testet i N = 4 replikat från samma lysat per tillstånd. Alla testförhållanden befanns ha antingen ingen statistisk eller ingen kliniskt signifikant inverkan av hgDNA-interferensen (grafiska data visas inte).

19.3 Överföringskontaminering

En studie genomfördes för att visa att fristående GeneXpert-kassetter för engångsbruk minskar överföringskontaminering vid körning av negativa prov efter körning av mycket högt positiva prov i samma GeneXpert-modul. Studien bestod av ett negativt prov som bearbetats i samma GeneXpert-modul omedelbart efter körning av ett högt positivt prov för ESR1/PGR/ERBB2/MKi67. Det negativa provet bestod av *in vitro*-transkriberat (IVT) RNA innehållande CYFIP1-transkript vid 5×10^4 kopior för att säkerställa förekomst av en referens för ett genmål. Det högt positiva provet bestod av IVT-RNA innehållande CYFIP1-transkript vid 5×10^5 kopior, och IVT-RNA innehållande ESR1-, PGR-, ERBB2- och MKi67-transkript vid 5×10^6 kopior, framställda som FFPE-lysat. Testschemat upprepades 41 gånger på en och samma GeneXpert-modul i totalt 20 högt positiva och 21 negativa prover. Alla 20 högt positiva prov rapporterade korrekt som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIV (POSITIVE) och alla 21 negativa prov rapporterades korrekt som ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIV (NEGATIVE).

19.4 Assayens reproducerbarhet och precision

Reproducerbarheten av Xpert Breast Cancer STRAT4 utvärderades med en panel av fem lysatprov.

Tre panelmedlemmar framställdes genom att tillsätta *in vitro* transkript (IVT) RNA i FFPE-lyseringsbuffert spetsad inom ~ 2 dCt-värden från dCt-värden cutoffs för ESR1 (1 IVT RNA), PGR (2 IVT RNA) och ERBB2 (3 IVT RNA) och med CYFIP1 Ct-värden $\sim 2-3$ Ct-värden från den minsta nivån för assay-inmatning.

Två panelmedlemmar (4 kliniska FFPE-prov och 5 kliniska FFPE-prov) skapades från poolade kliniska FFPE-prover i FFPE-lyseringsbuffert för att generera CYFIP1 Ct-värden nära den minimala assay-inmatningen och för att ha dCt-värde cutoffs för alla mål över det rapporterbara intervallet och, i den mån det är möjligt, nära assayens Ct-värde cutoffs.

Två operatörer vid vardera av de tre studieplatserna testade två paneler med fem prov per dag under sex testdagar (fem prov x sex dagar x två operatörer x två replikat x tre platser). Ett totalnummer på 72 replikat per prov testades. Tre loter med Xpert Breast Cancer STRAT4-kassetter användes vid var och en av de tre testplatserna. Xpert Breast Cancer STRAT4-testet utfördes enligt metoden i denna bruksanvisning.

Reproducerbarheten av Xpert Breast Cancer STRAT4 utvärderades i termer av dCt för vart och ett av de fyra målen för varje panel. Medelvärde, standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV) mellan platser, mellan loter, mellan dagar och mellan operatörer och inom assayer för varje panelmedlem visas i Tabell 5.

Tabell 5. Sammanfattning av reproducerbarhetsdata

Prov	Assaykanal (analyt)	N ^a	Medelvärde dCt	Mellan platser		Mellan loter		Mellan dagar		Mellan operatörer		Inom assay		Total	
				Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	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 kliniska prov	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

Prov	Assaykanal (analyt)	N ^a	Medelvärde dCt	Mellan platser		Mellan loter		Mellan dagar		Mellan operatörer		Inom assay		Total	
				Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)	Varians	CV (%)
5- FFPE kliniska prov	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 Resultat med giltiga delta Ct-värden utav 72

20 Referenser

- 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, Karaïskos 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.

16. REGULATION (EG) 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/EEG and 1999/45/EG (amending Regulation (EG) 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 Platser för Cepheid-huvudkontor

Huvudkontor

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Europeiska huvudkontor

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Teknisk assistans

Innan kontakt med Cepheid teknisk support, samla in följande information:

- Produktnamn
- Lotnummer
- Instrumentets serienummer
- Felmeddelanden (om några)
- Mjukvaruversion och, om tillämpligt, datorns service tag-nummer

USA




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















Frankrike

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

Kontaktinformation till alla kontor för Cepheid teknisk support finns tillgänglig på vår hemsida: www.cepheid.com/en/support/contact-us

23 Tabell med symboler

Symbol	Betydelse
	Katalognummer
	<i>In vitro</i> -diagnostisk medicinteknisk produkt
	CE-märkning – europeisk överensstämmelse

Symbol	Betydelse
	Auktoriserad representant inom den Europeiska gemenskapen
	Får ej återanvändas
	Batchkod
	Se bruksanvisningen
	Försiktighet
	Tillverkare
	Tillverkningsland
	Innehåller tillräckligt för n tester
	Kontroll
	Utgångsdatum
	Temperaturbegränsning
	Biologiska risker
	Auktoriserad representant i Schweiz
	Importör



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France



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



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



24 Revisionshistorik

Avsnitt	Beskrivning av ändringen
Tabell med symboler	CH REP- och importörsymboler lades till samt definitioner i symboltabellen. CH REP och importörsymboler lades till med adress i Schweiz.
Revisionshistorik	Uppdaterade tabell om revisionshistorik.