

GeneXpert.
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert[®] kit pro sledování rakoviny močového měchýře

REF GXBLAD-CM-CE-10



In vitro diagnostika září 2019



Ochranné známky, patenty a prohlášení o autorských právech

Cepheid®, logo Cepheid, GeneXpert®, Xpert® a Xpertise™ jsou ochranné známky společnosti Cepheid.

Armored RNA® je registrovaná ochranná známka společnosti Asuragen, Inc.

Windows® je ochranná známka společnosti Microsoft Corporation.

Armored RNA® je patentovaná technologie společně vyvinutá Asuragen Inc. a Cenetron Diagnostics, LLC pod americkými patenty č. 5 677 124, 5 919 625, 5 939 262 a dalšími patenty čekajícími na vyřízení.

Copyright © Cepheid 2016. Všechna práva vyhrazena.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA
www.cepheid.com



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France
www.cepheidinternational.com

Obsah

Oficiální název produktu.....	4
Běžný název produktu	4
Zamýšlené použití.....	4
Shrnutí a vysvětlení	4
Princip detekce	5
Reagencie a přístroje.....	6
Poskytovaný materiál.....	6
Skladování kitu a zacházení s ním	7
Požadovaný materiál, který není automatickou součástí dodávky	7
Varování a bezpečnostní opatření.....	7
Chemická nebezpečí	8
Odběr vzorků, přeprava a skladování	8
Vlastní postup.....	9
Příprava kazety	9
Zahájení testu	10
Zobrazení výsledků a jejich tisk	11
Kontrola kvality.....	11
Vestavěné kontroly kvality.....	11
Interpretace výsledků	11
Opakování testu	16
Limitace	16
Očekávané hodnoty	17
Hodnoty mezi zdravými dobrovolníky a pacienty se symptomy a/nebo historií rakoviny močového měchýře	17
Hodnoty u pacientů s historií rakoviny močového měchýře	18
Výkonostní charakteristiky	12
Výkon vs. standardní péče	12
Specifická.....	13
Analytická výkonnost	15
Minimální vstup do tesu	15
Analytická specifická.....	17
Interferující látky	17
Křížová kontaminace	19
Reproducibilita testu	20
Reference	21
Umístění centrály Cepheid.....	21
Technická podpora	21

Xpert[®] Bladder Cancer Monitor

Kit pro sledování rakoviny močového měchýře

Pouze pro diagnostiku *In Vitro*.

Oficiální název produktu

Xpert[®] Bladder Cancer Monitor

Běžný název produktu

Xpert Bladder Cancer Monitor, Xpert kit pro sledování rakoviny močového měchýře

Zamýšlené použití

Xpert[®] Bladder Cancer Monitor, kit pro monitorování rakoviny močového měchýře, prováděné na přístrojových systémech Cepheid GeneXpert[®], je kvalitativní diagnostický test *in vitro* určený ke sledování návratu rakoviny močového měchýře u pacientů, kterým byl dříve diagnostikován karcinom močového měchýře. Test používá vzorek moče a měří hladinu pěti cílových mRNA (ABL1, CRH, IGF2, UPK1B, ANXA10) pomocí reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Detekce rakoviny močového měchýře je indikována jako pomůcka pro standardní klinické vyhodnocení opětovného výskytu karcinomu močového měchýře u pacientů s anamnézou rakoviny močového měchýře a měla by být použita ve spojení s dalšími metodami pro stanovení diagnózy onemocnění.

Shrnutí a vysvětlení

Karcinom močového měchýře (UBC) je na světě 7. nejčastější rakovinou u mužů a 17. nejčastější rakovinou u žen.¹ UBC je častější v rozvinutých zemích a je 4., resp. 9. nejčastější rakovinou u mužů, resp. žen na západní polokouli. V 75 % nově diagnostikovaných UBC se jedná o nesvalovou invazivní rakovinu, zatímco 25 % zbývajících diagnóz jsou svalové invazivní rakoviny, které vyžadují radikální intervence.¹ Frekvence UBC v kombinaci s nejvyšší mírou recidivy všech rakovin zapříčiňuje obrovské zatížení zdravotních systémů. Výskyt UBC se sice v některých vyspělých zemích snížil, což se přičítá snížení užívání tabáku a zlepšené hygieně práce v průmyslových provozech, ale předpokládá se, že celosvětově incidence onemocnění roste, především v rozvojových zemích, zejména v Číně. Míra prevalence UBC je nejvyšší ze všech urologických karcinomů.¹ Ve Spojených státech incidence rakoviny močového měchýře stále roste u stárnoucí populace, s nejnovějšími odhady více než 74 000 případů v roce 2015. Kromě toho žije ve Spojených státech více než 500 000 pacientů s rakovinou močového měchýře.² V Evropské unii je incidence 27 na 100 000 u mužů a 6 na 100 000 u žen. Incidence, prevalence a úmrtnost se liší podle regionů a zemí.¹

Rakovina močového měchýře postihuje ve Spojených státech a Evropě především lidi starší 60 let.² Míra výskytu je u mužů téměř čtyřikrát vyšší než u žen a nejvyšší je u kavkazoidní rasy.²

Rakovina močového měchýře se nejčastěji vyskytuje společně s mikroskopickou nebo s bezbolestnou makroskopickou hematurií, což platí pro přibližně 80–90 % pacientů s diagnózou rakoviny močového měchýře. U lidí s pokročilým onemocněním, se kromě hematurie častěji vyskytují příznaky, jako je bolest zad nebo pánevní bolesti. Diagnostika prozatím vyžaduje invazivní testy.

Rakovina močového měchýře má nejvyšší míru recidivy mezi malignitami, často až 70 % během pěti let po úspěšné léčbě. Tato vysoká míra recidivy/progrese onemocnění vyžaduje jako prostředek včasné diagnostiky a léčby pečlivé a přesné monitorování, protože toto sledování dramaticky zlepšuje přežití pacientů.

Nyní je potřeba zlepšit senzitivitu a zkrátit čas potřebný pro detekci onemocnění u pacientů, kteří již rakovinu močového měchýře prodělali. Kit pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert využívá přístrojové systémy Cepheid GeneXpert k měření exprese pěti cílů mRNA ve vzorku moči v samostatné kazetě. Toto snadno použitelné a rychlé řešení vyžaduje méně než dvě minuty práce "hands-on time" a celkovou dobu na provedení celého diagnostického testu přibližně 90 minut.

Princip detekce

Přístroje a systémy GeneXpert automatizují a integrují zpracování vzorků, amplifikaci nukleových kyselin a detekci cílových sekvencí pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) a reverzní transkripce (RT-PCR). Systémy se skládají z přístroje, osobního počítače a předinstalovaného softwaru pro provádění testů a prohlížení výsledků. Systémy vyžadují použití jednorázových kazet na jedno použití, které obsahují činidla PCR a ve kterých probíhá samotná PCR. Protože jsou zásobníky samostatné a vzorky nikdy nepřijdou do styku s pracovními částmi přístrojových modulů, je možnost zkřížené kontaminace mezi vzorky minimalizována. Úplný popis systému naleznete v příručce *GeneXpert Dx System Operator Manual* nebo *GeneXpert Infinity System*.

Detekce rakoviny močového měchýře Xpert zahrnuje činidla pro detekci pěti cílů mRNA (ABL1, ANXA10, UPK1B, CRH a IGF2). ABL1 slouží jako kontrola vzorku vzorku (SAC). ABL1 zajišťuje, že vzorek obsahuje lidské buňky a lidskou RNA. Pro platný výsledek testu je vyžadován pozitivní signál ABL1. Součástí reakce je kontrola sond (PCC) pro ověření rehydratace činidla, naplnění PCR zkumavky v kazetě, integrity sondy a stability barviva. V každé kazetě je obsažena interní kontrola Cepheid (CIC), určená k detekci možné inhibice qRT-PCR.


Vzorky moči musí být nejprve ošetřeny soupravou Xpert® pro transport moči. Děje se tak přenosem 4,5 ml moči do zkumavky pro transport moči a promícháním trojnásobným převrácením. Přenosová pipeta Xpert se používá k přenosu 4 ml ošetřené moči do vzorkové komory kazety.

Všechna činidla potřebná pro přípravu vzorku a RT-PCR analýzu jsou předem vložena do patrony. Buňky ve vzorku moči jsou zachyceny na filtru a lyzovány sonikací. Uvolněná nukleová kyselina se eluuje, smísí se s vysušenými reagenty RT-PCR a roztok se přenesse do reakční zkumavky pro RT-PCR a detekci. Čas do výsledku je přibližně 90 minut.

Kit pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert poskytuje POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ výsledky testů na základě algoritmu lineární diskriminační analýzy (LDA), který využívá výsledky prahu cyklů (Ct) pěti cílů mRNA. Pro pozitivní výsledek testu není nutné detekovat všechny cíle mRNA.

Reagencie a přístroje

Poskytovaný materiál

 Kit pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert obsahuje dostatečné množství činidel pro zpracování 10 vzorků pro kontrolu kvality a/nebo vzorků moči ošetřených soupravou pro přepravu moči Xpert (# GXUTR-CE-30). Souprava detekce rakoviny močového měchýře Xpert obsahuje následující:

Xpert Bladder Cancer Monitor

- Kazety s integrovanými reakčními zkumavkami: 10
- Korálky velikosti 1, 2, 3 (lyofilizováno) : od každého druhu 1 na kazetu
- Eluční reagent: 1,5 ml na kazetu
- Jednorázové přenosové pipety: 1 sáček deseti pipet na kit
- CD: 1 na kit
- Testovací soubor
- Příbalový leták

Bezpečnostní listy (SDS) jsou k dispozici na www.cepheid.com nebo www.cepheidinternational.com na kartě PODPORA.

Hovězí sérový albumin (BSA) v korálcích v tomto produktu byl vyroben výhradně z hovězí plazmy pocházející ze Spojených států. Zvířata nebyla krmena žádnou bílkovinou přežvýkavců ani jinou živočišnou bílkovinou; zvířata podstoupila zkoušky před porážkou a po porážce. Během zpracování nedošlo k mísení materiálu s jinými živočišnými materiály.

Skladování kitu a zacházení s ním



- Náplně a činidla kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert uchovávejte při teplotě 2–28 °C.
- Neotevírejte víko kazety, dokud nejste připraveni provést testování.
- Použijte kazetu do 30 minut po otevření víka.
- Nepoužívejte vyteklou kazetu.

Požadovaný materiál, který není automatickou součástí dodávky

- Souprava Xpert pro transport moči (GXUTR-CE-30) pro ošetření primárních vzorků moči. Souprava se skládá ze zkumavky Xpert Urine Transport Reagent a přenosové pipety.
- Přístrojový systém GeneXpert nebo Infinity System GeneXpert (katalogové číslo se liší podle konfigurace): šestikanálový přístroj GeneXpert, počítač se softwarem GeneXpert verze 4.7 b nebo vyšší, nebo Xpertise verze 6.4 b nebo vyšší, skener čárových kódů a příslušný návod k obsluze GeneXpert Instrument System.
- Tiskárna: Pokud je požadována tiskárna, obraťte se na technickou podporu společnosti Cepheid a zajistěte nákup doporučené tiskárny.

Varování a bezpečnostní opatření

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Se všemi biologickými vzorky by mělo být zacházeno, jako by byly schopné přenášet infekční agens. Všechny lidské vzorky by měly být ošetřeny standardními opatřeními. Pokyny pro nakládání se vzorky jsou k dispozici od Světové zdravotnické organizace nebo Centra pro kontrolu a prevenci nemocí v USA.
- Při práci s chemikáliemi a manipulaci s biologickými vzorky dodržujte bezpečnostní postupy vaší instituce.
- Výkonnostní charakteristiky této zkoušky byly stanoveny u typu vzorku uvedeného v části Zamýšlené použití. Výkon tohoto testu s jinými typy vzorků nebo vzorky nebyl hodnocen. Vzorky moči musí být ošetřeny soupravou Xpert Urine Transport Reagent Kit (katalogové číslo GXUTR-CE-30).
- Neotevírejte kazetu kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert s výjimkou přidávání vzorku ošetřeného transportním činidlem moči Xpert.
- Nepoužívejte kazetu, která spadla nebo byla otřesena.
- Nepoužívejte kazetu s poškozenou zkumavkou.
- Každá kazeta kitu Xpert pro sledování rakoviny močového měchýře se používá ke zpracování jednoho testu. Kazety nepoužívejte opakovaně.
- Jednorázová pipeta na jedno použití se používá k přenosu jednoho vzorku. Pipetu nepoužívejte opakovaně.
- Nepoužívejte kazetu, pokud je mokrá nebo pokud je těsnění víka poškozené.
- Nepokládejte štítek s ID vzorku na víko kazety nebo na štítek s čárovým kódem.
- Doporučují se správné laboratorní postupy, včetně výměny rukavic mezi manipulací se

vzorky pacientů, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků nebo činidel.

- Ohledně správné likvidace použitých kazet a nepoužitých činidel se obraťte na pracovníky zabývající se odpadem vaší instituce. Zkontrolujte státní, územní nebo místní předpisy, protože se mohou lišit od národních předpisů pro likvidaci. Materiál může vykazovat vlastnosti nebezpečného odpadu vyžadující specifické požadavky na likvidaci. Instituce by měly zkontrolovat své požadavky na likvidaci nebezpečného odpadu.

Chemická nebezpečí

Podle nařízení (ES) č. 1272/2008 (CLP) se tento materiál nepovažuje za nebezpečný.

Odběr vzorků, přeprava a skladování

- Používejte pouze vzorky moči ošetřené soupravou Xpert pro transport moči (# GXUTR-CE-30).

Při shromažďování a manipulaci se vzorky moči postupujte podle pokynů výrobce.

- Vzorky moči musí být přeneseny do zkumavek pro transport moči Xpert do jedné hodiny od primárního odběru. Před přenosem moči do zkumavky pro transport moči Xpert se ujistěte, že nádoba na sběr moči byla třikrát převrácena, aby se promíchala.
- Vzorky moči uložené ve zkumavkách pro přepravu moči Xpert musí být přepravovány do laboratoře při 2–28 °C.
- Vzorky moči ve zkumavkách pro transport moči Xpert jsou pro testování kitem pro detekci rakoviny močového měchýře Xpert použitelné až sedm dní při uchování při teplotě 2 až 28 °C.

Vlastní postup

Příprava kazety

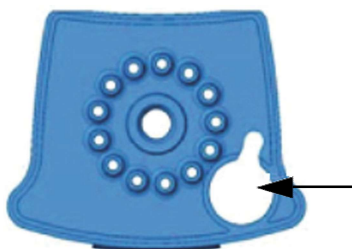
Důležité: Spust'íte test do 30 minut od přidání vzorku do kazety.

1. Vyjměte kazetu z obalu.
2. Zkumavku pro transport moči Xpert převrat'íte třikrát tam a zpět, aby se moč promíchala.
3. Otevřete víko kazety.
4. Otevřete transportní zkumavku.
5. Naplňte pipetu vzorkem po značku 4 ml.
 - A. Stiskněte hlavičku přenosové pipety.
 - B. Vložte pipetu do transportní zkumavky.
 - C. Uvolněte hlavičku a naplňte přenosovou pipetu ke značce 4 ml.
 - D. Zbývající vzorek uschovejte při 2–28 ° C pro případ potřeby opakovat test.



Obrázek 1. Přenosová pipeta kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert.

6. Vyprázdněte obsah pipety do vzorkové komory kazety.



Obrázek 2. Kazeta kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert.

Šipka označuje otvor vzorkové komory.

7. Zavřete víko kazety.

Zahájení testu

Důležité: Před zahájením testu se ujistěte, že je do softwaru importován soubor Xpert pro sledování rakoviny močového měchýře (ADF).

V této části jsou uvedeny výchozí kroky pro provoz přístrojů GeneXpert. Podrobné pokyny naleznete v provozní příručce systému GeneXpert Dx nebo v příručce GeneXpert Infinity System, v závislosti na používaném modelu.

Poznámka: Kroky, které provedete, se mohou lišit od uvedených, pokud správce systému změnil výchozí pracovní postup systému.

1. Zapněte přístrojový systém GeneXpert:

- Pokud používáte nástroj GeneXpert Dx, nejprve zapněte přístroj a poté zapněte počítač. Software GeneXpert se spustí automaticky nebo může vyžadovat dvojité kliknutí na ikonu zástupce softwaru GeneXpert Dx na ploše Windows®.

nebo

- Pokud používáte nástroj GeneXpert Infinity, zapněte jej. Software Xpertise se spustí automaticky nebo může vyžadovat dvojité kliknutí na ikonu zástupce softwaru Xpertise na ploše Windows.

2. Přihlaste se k softwaru GeneXpert Instrument System pomocí svého uživatelského jména a hesla. V okně GeneXpert System klikněte na **Create Test** (GeneXpert Dx) nebo klikněte na **Orders** a **Order Test** (Infinity). Otevře se okno **Create Test**.

3. Naskenujte nebo zadejte ID vzorku. Pokud zadáváte ID vzorku, ujistěte se, že ID vzorku je zadáno správně. ID vzorku je přidruženo k výsledkům testu a je zobrazeno v okně **View results** a ve všech zprávách. Zobrazí se dialogové okno **Scan Cartridge**.

4. Naskenujte čárový kód na kazetě kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert. Zobrazí se okno **Create test**. Pomocí informací z čárového kódu software automaticky vyplní pole do následujících polí: **Select Assay, Reagent Lot ID, Cartridge SN**.

5. Klepněte na **Start Test** (GeneXpert Dx) nebo **Submit** (Infinity). Na požádání zadejte své heslo.

6. U infračerveného systému GeneXpert umístěte kazetu na dopravní pás. Kazeta bude automaticky načtena, test bude spuštěn a použitá kazeta bude umístěna do odpadního kontejneru.

nebo

Pro nástroj GeneXpert Dx:

A. Otevřete dvířka přístrojového modulu blikajícím zeleným světlem a vložte kazetu.

B. Zavřete dveře. Test se spustí a zelené světlo přestane blikat. Po dokončení testu zhasne světlo.

C. Před otevřením dveří modulu počkejte, až systém uvolní zámek dveří. Vyjměte kazetu.

D. Použité kazety zlikvidujte v příslušných nádobách na vzorky podle běžných postupů vaší instituce.

Zobrazení výsledků a jejich tisk

V této části jsou uvedeny základní kroky pro prohlížení a tisk výsledků. Podrobnější pokyny, jak zobrazit a tisknout výsledky, najdete v příručce GeneXpert Dx System Operator Manual nebo GeneXpert Infinity System Operator Manual, v závislosti na použitém přístroji.

1. Klepnutím na ikonu **View results** zobrazíte výsledky.
2. Po dokončení testu klikněte na tlačítko **Report** v okně **View results** a zobrazte nebo vygenerujte PDF soubor zprávy.

Kontrola kvality

Vestavěné kontroly kvality

Každý test zahrnuje vnitřní kontrolu (CIC), kontrolu sondy (PCC) a kontrolu ABL1.

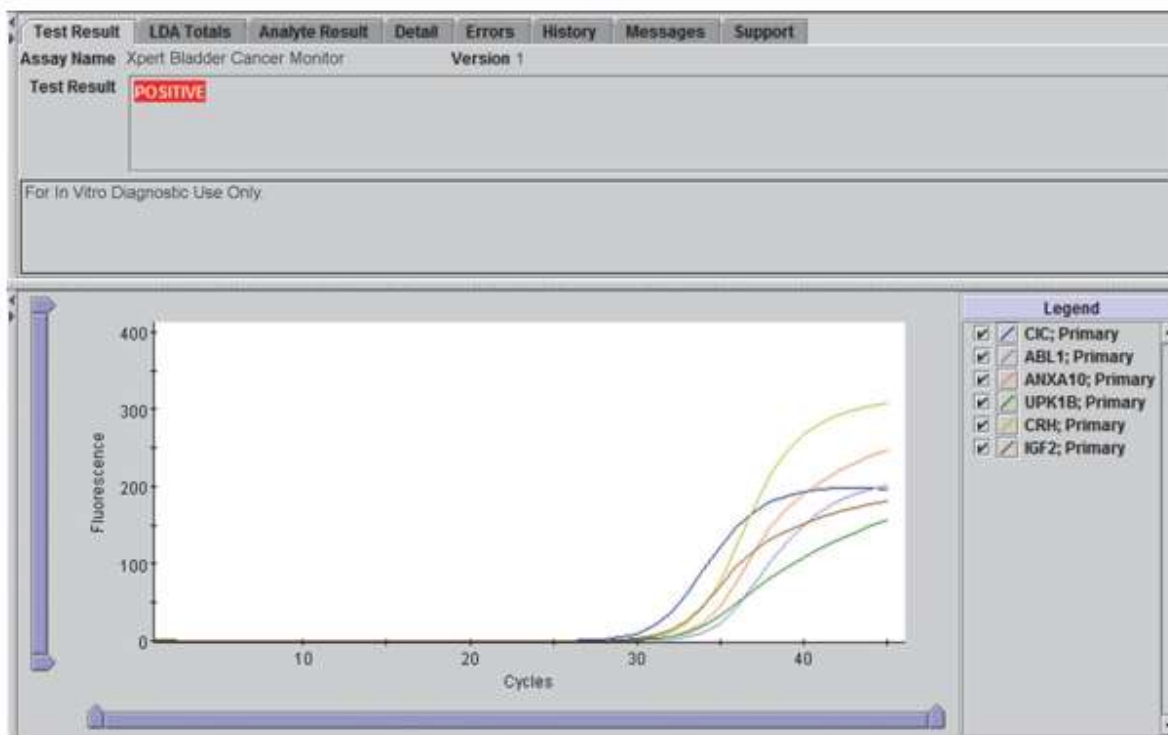
- **Cepheid Internal Control (CIC):** CIC je armored RNA®, která je součástí každé kazety. Slouží ke kontrole případné inhibice RT-PCR v každém vzorku. CIC projde, pokud splní předem definovaná akceptační kritéria.
- **Kontrola sond (PCC):** Před zahájením PCR změří přístrojový systém GeneXpert fluorescenční signál ze sond pro sledování rehydratace kuliček, plnění reakční zkumavky, integritu sondy a stálost barviva. PCC projde, pokud splní předem definovaná akceptační kritéria.
- **Kontrola ABL1:** Tato kontrola vzorku vzorku (SAC) zajišťuje, že vzorek obsahuje lidské buňky a lidskou RNA. Signál ABL1 je vyžadován pro platný výsledek testu. Negativní ABL1 znamená, že vzorek neobsahuje dostatečné množství lidských buněk nebo že se vzorek degradoval.
- **Externí kontroly** (nejsou součástí dodávky): Externí kontroly by měly být používány v souladu s požadavky místních, státních a federálních akreditačních organizací.

Interpretace výsledků

Výsledky jsou interpretovány přístrojovým systémem GeneXpert z naměřených fluorescenčních signálů a zabudovaných výpočtových algoritmů a budou zobrazeny v okně **View results** na kartách **Test Results**, **LDA Totals** a **Analyte Result**. Výsledek testu, součty LDA a výsledky analýzy jsou také uvedeny ve zprávě o testu.

Tabulka 1. Reprezentativní výsledky a jejich interpretace

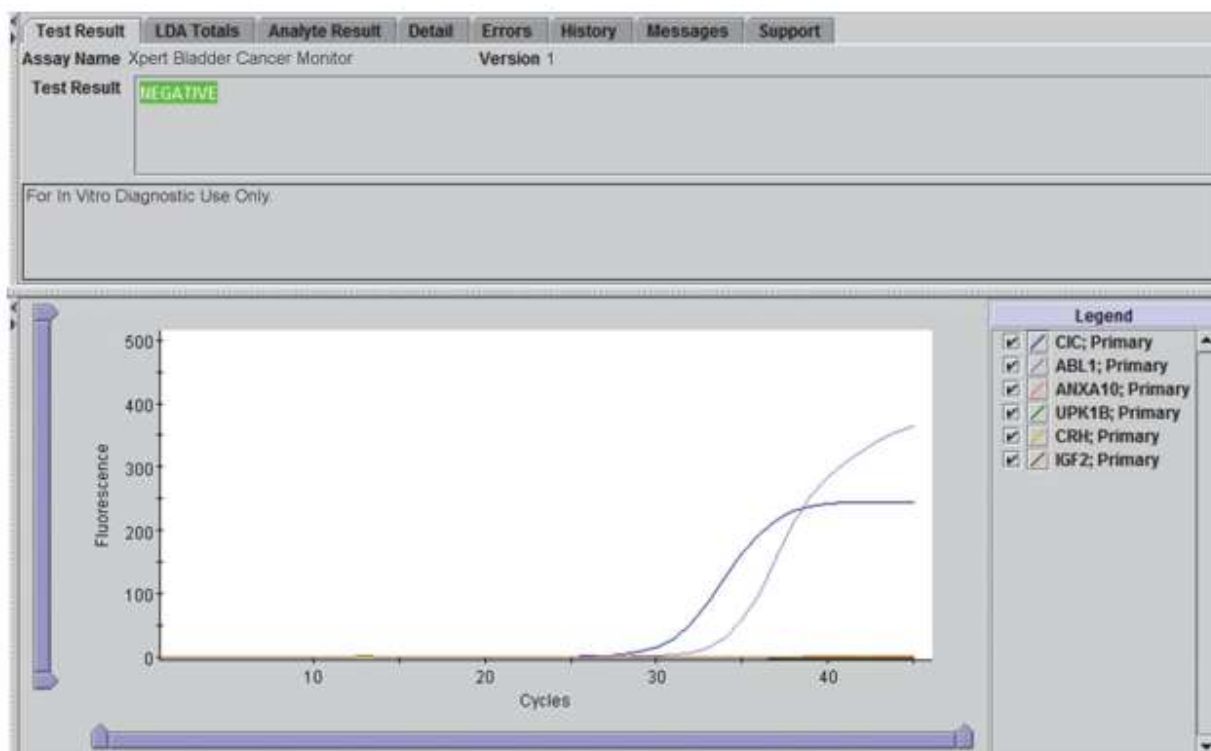
Výsledek	Interpretace
<p>POSITIVE</p> <p>Viz obr. 3 a obr. 4</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LDA Celkem (výsledek algoritmu, který používá hodnoty Ct ABL1, ANXA10, UPK1B, CRH a IGF2) je roven mezní hodnotě nebo je nad mezní hodnotou. • LDA Celkem musí být v platném rozsahu -20 až 20. • ABL1: ABL1 Ct je v platném rozsahu. • CIC: Nelze použít. Výsledky CIC jsou ignorovány, protože cíle testu v pozitivních vzorcích mohou interferovat s touto kontrolou. • PCC– PASS; všechny výsledky kontroly sondy projdou
<p>NEGATIVE</p> <p>Viz obr. 5 a obr. 6</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LDA Celkem je pod cut off limitem. • ABL1: ABL1 Ct je v platném rozsahu. • CIC: CIC Ct je v platném rozsahu. • PCC– PASS; všechny výsledky kontroly sondy projdou
<p>INVALID</p> <p>Viz obr. 7 a obr. 8</p>	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost cílových mRNA nelze určit.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ABL1 a CIC: ABL1 Ct a/nebo CIC Ct nesplňují akceptační kritéria nebo jedna nebo více růstových křivek nesplňuje akceptační kritéria. • PCC– PASS; všechny výsledky kontroly sondy projdou • Obsah buněk ve vzorku je příliš nízký, byla inhibována PCR nebo vzorek nebyl správně odebrán.
<p>ERROR</p>	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost cílových mRNA nelze určit.</p> <ul style="list-style-type: none"> • PCC FAIL; všechny nebo jeden z výsledků kontroly sondy selže. • Možné důvody chyby zahrnují nesprávně naplněnou reakční zkumavku, byl detekován problém integrity reagenční sondy, překročeny tlakové limity nebo byla zjištěna chyba polohy ventilu.
<p>NO RESULT</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Přítomnost nebo nepřítomnost cílových mRNA nelze určit. • NO RESULT naznačuje, že nebylo shromážděno dostatek údajů. Operátor například zastavil probíhající test. • PCC– NA (not applicable, nepoužitelné)



Obrázek 3. Výsledek pozitivní, POSITIVE

Category Name	Min Valid	Cutoff	Max Valid	LDA Total
LDA	-20.0000	0.5000	20.0000	0.7375

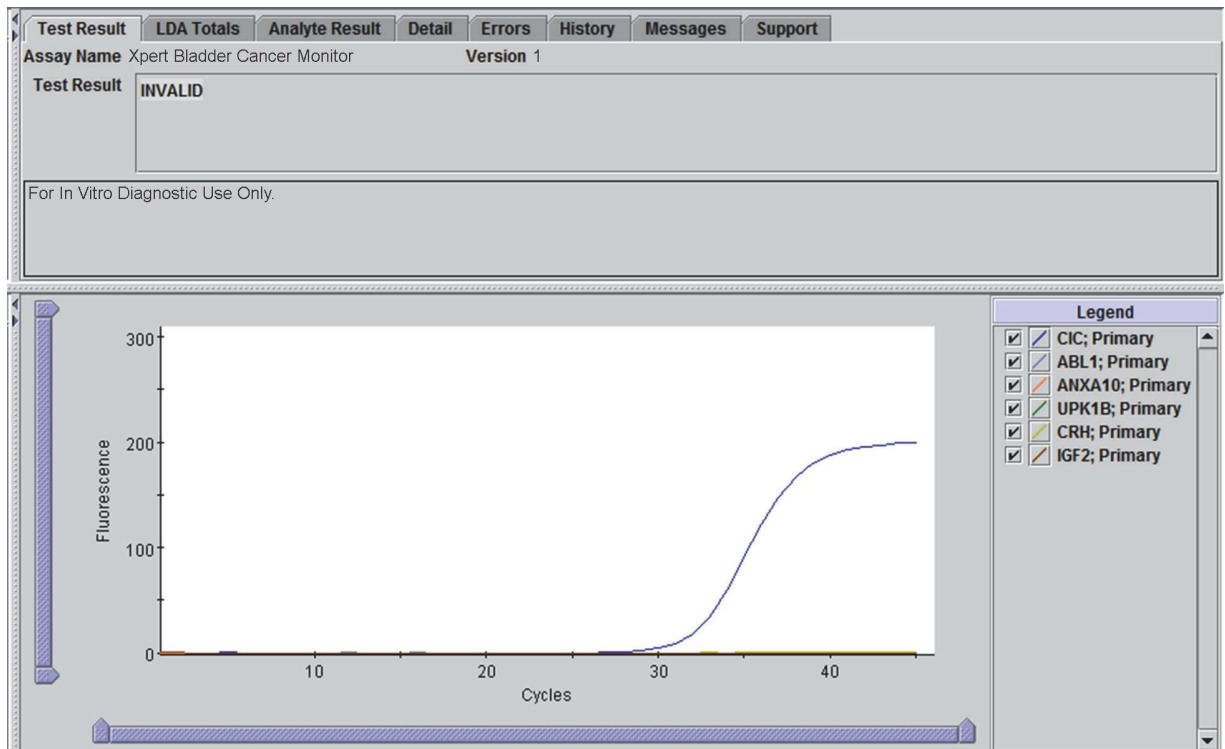
Obrázek 4. LDA Celkem – Výsledek pozitivní, POSITIVE



Obrázek 5. Výsledek negativní, NEGATIVE

Category Name	Min Valid	Cutoff	Max Valid	LDA Total
LDA	-20.0000	0.5000	20.0000	0.0138

Obrázek 6. LDA Celkem – Výsledek negativní, NEGATIVE



Obrázek 7. Výsledek neplatný, INVALID

Category Name	Min Valid	Cutoff	Max Valid	LDA Total
LDA	-20.0000	0.5000	20.0000	

Obrázek 8. LDA Celkem – Výsledek neplatný, INVALID

Opakování testu

Chcete-li znovu otestovat vzorek s výsledkem WITHOUT RESULT, INVALID nebo ERROR, použijte novou kazetu (kazetu nepoužívejte opakovaně).

Limitace

Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon testu. Výsledky detekce karcinomu močového měchýře kitem Xpert musí být interpretovány ve spojení s dalšími laboratorními a klinickými údaji, které má lékař k dispozici.

Výkon kitu pro detekci rakoviny Xpert močového měchýře byl validován pomocí postupů uvedených v tomto příbalovém letáku pouze pomocí vzorků moči odebraných od subjektů ve věku od 19 do 95 let.

Kit pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert detekuje ABL1, CRH, IGF2, UPK1B a ANXA10 mRNA ve vzorcích moči. Nemoci a léky, které způsobují zvýšené hladiny těchto mRNA v moči, mohou vést k pozitivnímu výsledku testu.

Nesprávné výsledky testu mohou nastat při nesprávném odběru vzorků, nesprávné manipulaci nebo skladování nebo smíchání vzorků. Aby nedocházelo k chybným výsledkům, je nutné pečlivě dodržovat pokyny uvedené v tomto příbalovém letáku.

Interference testu může být pozorována v přítomnosti albuminu, bilirubinu, hemoglobinu, plné krve, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), nitrofurantoinu a fenazopyridinu-HCl. Maximální tolerované hladiny těchto látek, jak je uvedeno v tabulce 7, jsou:

2,4 g/dl pro albumin,

11,25 mg/dl pro bilirubin,

0,96 g/dl pro hemoglobin,

1 % pro plnou krev,

6⁶ CFU/ml pro *Candida albicans*,

6⁵ CFU/ml pro *Escherichia coli*,

6⁷ CFU/ml pro *Pseudomonas aeruginosa*,

5,5⁶ CFU/ml pro BCG,

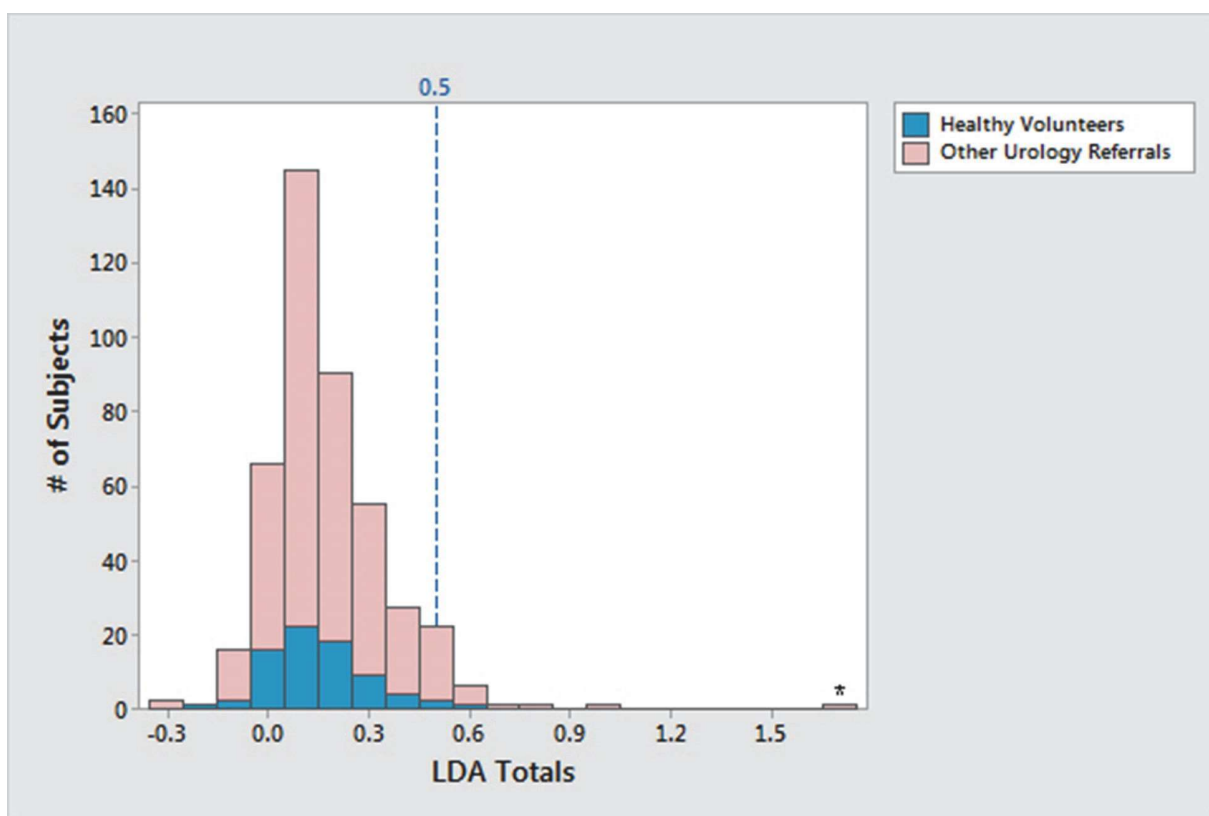
60 mg/dl pro nitrofurantoin,

25,32 mg/dl pro fenazopyridin-HCl.

Očekávané hodnoty

Hodnoty mezi zdravými dobrovolníky a pacienty se symptomy a/nebo historií rakoviny močového měchýře

Detekce karcinomu močového měchýře kitem Xpert byla provedena se vzorky moči od zdravých dobrovolníků (modře) a pacientů s příznaky nebo historií karcinomu močového měchýře (růžově), jako součást studie specificity testu (viz také Specificita v části Klinická výkonnost). Rozdělení součtů LDA je znázorněno na obrázku 9. Mezní hodnota testu je označena modrou tečkovanou čarou.

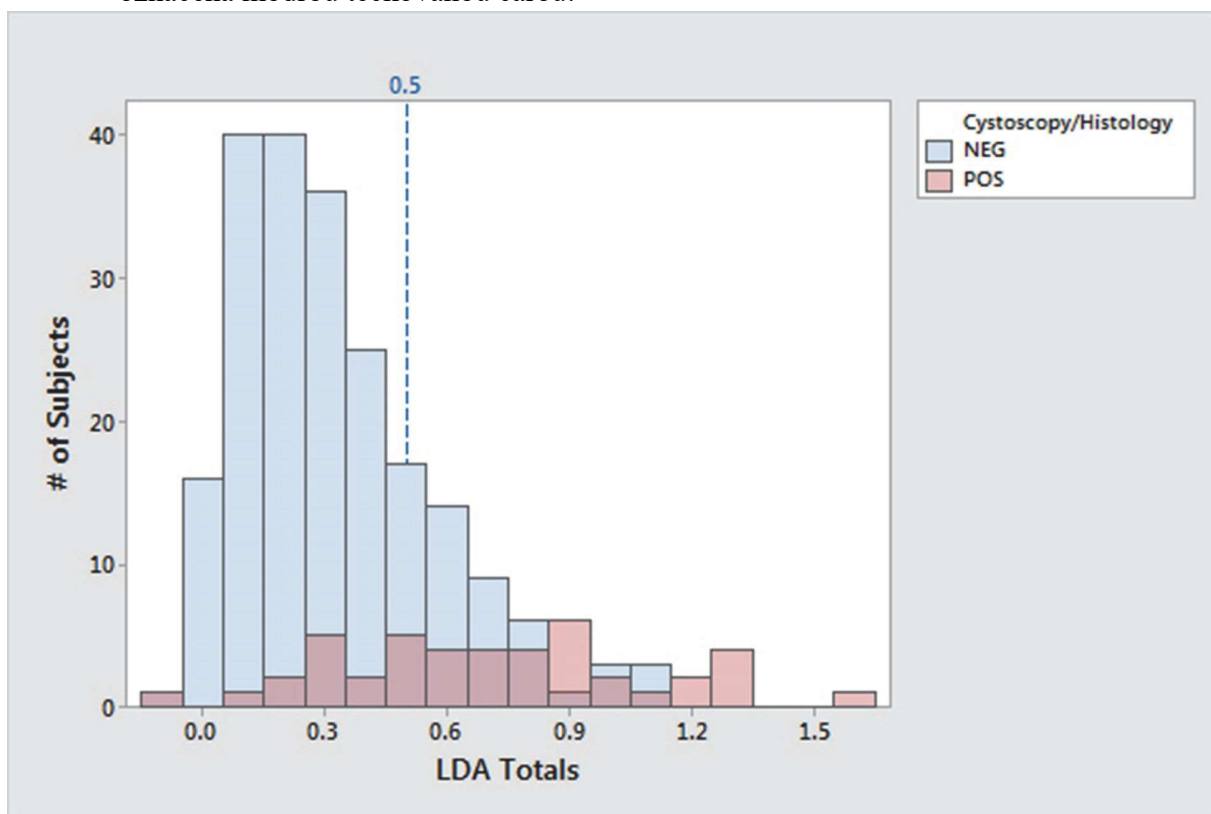


Obrázek 9. Histogram součtů LDA mezi zdravými dobrovolníky a urologickými pacienty

* Jednomu subjektu byla diagnostikována rakovina močového měchýře (vnější sloupec zcela vpravo, maximální LDA)

Hodnoty u pacientů s historií rakoviny močového měchýře

Distribuce výsledků LDA mezi vzorky odebranými v prospektivní studii od subjektů s počáteční diagnózou rakoviny močového měchýře nebo s návratem rakoviny močového měchýře do 9 měsíců od ukončení léčby je znázorněna na obrázku 10. (Viz také Výkon vs. standardní péče). Distribuce je uvedena u jedinců, kteří na základě výsledků cystoskopie a histologie měli (POS) a neměli (NEG) rakovinu močového měchýře. Mezní hodnota testu je označena modrou tečkovanou čarou.



Obrázek 10. Histogram součtu LDA u jedinců s historií rakoviny močového měchýře.

Výkonostní charakteristiky

Výkon vs. standardní péče

Výkonostní charakteristiky kitu Xpert pro sledování rakoviny močového měchýře byly hodnoceny v laboratořích v USA, Kanadě a EU. Mezi zkoumané subjekty patřili jednotlivci, kteří s nově diagnostikovanou rakovinou močového měchýře nebo s navrácenou rakovinou do devíti měsíců od ukončení léčby. Od těchto pacientů byly odebrány vzorky moče pro testování kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert.

Výsledky sledování karcinomu močového měchýře kitem Xpert byly porovnány s cystoskopií, s histologickým potvrzením pozitivních a podezřelých cystoskopií. Pacienti s pozitivními nebo podezřelými cystoskopiemi, ale negativními histologickými nálezy, byli považováni za negativní na rakovinu močového měchýře. Subjekty s pozitivními a/nebo podezřelými výsledky cystoskopie, u nichž histologie chyběla, byly z analýzy vyloučeny. Do této studie bylo původně zařazeno celkem 363 subjektů, z nichž 255 bylo způsobilých k zařazení do analýzy a mělo platné výsledky sledování rakoviny močového měchýře kitem Xpert.

Demografické údaje pro 255 subjektů jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Souhrn demografie: studie sledování rakoviny močového měchýře

Kategorie		N (%)	
Pohlaví	Muži	204 (80 %)	
	Ženy	51 (20 %)	
Rasa	Kavkazoidní	244 (95,7 %)	
	Hispánská	2 (0,8 %)	
	Afroamerická	7 (2,7 %)	
	Asijská	1 (0,4 %)	
	Jiná	1 (0,4 %)	
Kuřácká minulost	Současný kuřák	46 (18 %)	
	Dřívější kuřák	149 (58,4 %)	
	Nekuřák	60 (23,5 %)	
Historie terapie	Chemoterapie	71 (27,8 %)	
	Imunoterapie	408 (34,1 %)	
	Bez ošetření	97 (38 %)	
Věk (roky)			Průměr ± SD (Rozsah)
	Průměr	255	71,1 ± 10,8 (30-96)
	Muži	204 (80 %)	71,4 ± 10,9 (30-93)
	Ženy	51 (20 %)	69,7 ± 10,6 (38-96)

Celkově detekce rakoviny močového měchýře kitem Xpert prokázala senzitivitu 75 % a specificitu 80,6 % vzhledem k cystoskopii/histologii (tabulka 3). Citlivost mezi nádory vysokého stupně byla 84 % [(21/25) 95 % CI: 65,3-93,6]. Citlivost mezi nádory nízkého stupně byla 63,2 % [(12/19) 95 % CI: 41,0-80,9].

Tabulka 3. Sledování rakoviny močového měchýře kitem Xpert vs. cystoskopie/histologie

		Cytoskopie/Histologie		
		Poz	Neg	Celkem
Xpert Bladder	Poz	33	41	74
	Neg	11	170	181
	Celkem	44	211	895
		Senzitivita	75.0 % (95% CI 60.6-85.4),	
	Specificita	80.6 % (95% CI 74.7-85.3)		
	PPV	44.6 % (95% CI 33.8-55.9)		
	NPV	93.9 % (95% CI 89.4-96.4)		
	Přesnost	79.6 % (95% CI 74.2-84.1)		
	Prevalence	17.3 % (95% CI 13.1-22.4)		

Testy sledování karcinomu močového měchýře kitem Xpert pro 96,1 % (249/259) vzorků studie byly úspěšné při prvním pokusu s celkovou mírou neurčitosti 3,9 %. Neurčité případy zahrnovaly 6 výstupů INVALID, 3 ERROR a 1 výstup NO RESULT. 7 z 10 neurčitých případů bylo znovu testováno, z nichž 6 přineslo po opakování testu platné výsledky. Celková míra úspěšnosti testu byla 98,5 % (255/259).

Specificita

Kromě klinické specificity 80,6 % stanovené ve studii sledování karcinomu močového měchýře byla provedena multicentrická prospektivní studie s cílem stanovit specificitu kitu pro sledování karcinomu močového měchýře Xpert u zdravých dobrovolníků a pacientů s urologií bez předchozí anamnézy nebo klinického důkazu rakoviny močového měchýře. Do této studie bylo původně zařazeno celkem 537 subjektů, z nichž 508 bylo způsobilých k zařazení do analýzy a mělo platné výsledky detekce rakoviny močového měchýře kitem Xpert. Populace pacientů je shrnuta v tabulce 4.

Tabulka 4. Souhrn demografie: Studie specifity sledování rakoviny močového měchýře kitem Xpert

Kategorie		N (%)
Pohlaví		
	Muži	341 (67,1 %)
	Ženy	167 (32,9 %)
Kuřácká minulost		
	Současný kuřák	52 (10,2 %)
	Dřívější kuřák	196 (38,6 %)
	Nekuřák	260 (51,2 %)
Rakovina		
	V minulosti genitourinální rakovina	73 (14,4 %)
	V minulosti jiná rakovina	32 (6,3 %)
	Minulost bez rakoviny	403 (79,3 %)

Kategorie		N (%)	
Věk (roky)			Průměr ± SD (rozsah)
	Průměr	508	62.1 ± 15.1 (19-91)
	Muži	341 (67,1 %)	64.5 ± 14.9 (20-91)
	Ženy	167 (32,9 %)	57.2 ± 14.3 (19-89)

Celková specificita detekce rakoviny močového měchýře kitem Xpert u zdravých dobrovolníků a urologických pacientů bez předchozí anamnézy nebo klinického důkazu rakoviny močového měchýře byla 95,3 % (484/508). Vzorky od 98,6 % (73/74) zdravých dobrovolníků byly v testu kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert negativní. Souhrn celkové specificity a specificity podle skupiny je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Detekce karcinomu močového měchýře kitem Xpert vs. klinický stav

Skupina	N	TP	FP	TN	FN	Specificita (%) (95 % CI)
Zdraví dobrovolníci	74	NA	1	73	NA	98,6 % (92,7-99,8)
Další	434	NA	23	411	NA	84,7 % (92,2-96,4)
Kombinace	508	NA	24	484	NA	95,3 % (93,1-96,8)

TP = true positive, pravdivě pozitivní, FP = false positive, falešně pozitivní, TN = true positive, pravdivě pozitivní, FN = false negative, falešně negativní. Ostatní = subjekty postoupené k urologické konzultaci bez předchozí anamnézy rakoviny močového měchýře nebo s klinickým důkazem rakoviny močového měchýře.

Analytická výkonnost

Minimální vstup do testu

Buněčné a ABL1 mRNA koncentrace, které jsou vysoce korelovány, se mezi vzorky moči značně liší. ABL1 RT-PCR poskytuje robustní výsledky do 36. cyklu. ABL1 slouží jako kontrola adekvátnosti vzorku (SAC) a maximální přípustná hodnota Ct pro platný výsledek testu je nastavena na 36. cyklus, což definuje minimální vstup do testu. Při použití této mezní hodnoty adekvátnosti vzorku s 255 vzorky moči bylo procento neurčených vzorků 3,9 %, citlivost 75 % a specificita 80,6 %.

Provedení testu bylo testováno poblíž mezní hodnoty adekvátnosti vzorku a minimální koncentrace buněk vyžadovaná pro splnění požadavku adekvátnosti vzorku byla odhadnuta pomocí dvou buněčných linií (SW780, ATCC® CRL-2169 a BE(2) -c, ATCC® CRL-2268). Nejprve byly připraveny slepé vzorky (n = 30) přidáním jednotlivých vzorků moči do stejných objemů činidla pro transport moči Xpert a filtrací k odstranění endogenních buněk. Pro každý vzorek moči byly testovány dva replikáty s každou ze dvou šarží reagensů. Všechny výsledky testu byly INVALID (neplatné), protože nebyl detekován ABL1 nebo Ct byla vyšší než 36,0. Zbývající objemy slepých vzorků byly poté spojeny a použity pro ředění buněčných linií.

Minimální koncentrace buněk potřebná k dosažení 19 z 20 replikátů s ABL1 Ct rovným nebo menším než 36,0 byla stanovena pomocí logistické regrese a testováním 20 replikátů při minimálně pěti koncentracích během tří dnů testování. Studie byla provedena se dvěma různými šaržemi kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert a výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6. Minimální vstup do testu při detekci rakoviny močového měchýře kitem Xpert

Buněčná linie	Odhady minimálního vstupu do testu (v buňkách/ml nekonzervovaného vzorku) (Logit) (dolní a horní interval spolehlivosti 95%)	
	Šarže 1	Šarže 2
SW780	13,4 (11,4-18,7)	12,4 (10,6-16,9)
BE(2)-c	42,6 (34,0-61,9)	22,5 (19,1-30,3)

Analytická specifická

Primery a sondy v detekci rakoviny močového měchýře Xpert byly navrženy tak, aby amplifikovaly mRNA a vyhnuly se amplifikaci lidské genomové DNA. Pro stanovení, zda kit pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert amplifikuje a detekuje lidskou genomovou DNA, byla lidská genomová DNA (Promega G304A) zavedena přímo do testu RT-PCR v koncentracích 40 ng/ml, 400 ng/ml a 4 µg/ml. Bylo testováno osm replikátů na každou koncentraci lidské genomové DNA a osm kontrol bez přidané DNA. Výsledky Ct pro všechny cíle (ABL1, ANXA10, UPK1B, CRH a IGF2) byly ve všech replikátech nulové (cíle nebyly detekovány). Tyto výsledky ukazují, že tímto kitem Xpert Bladder nebyla detekována žádná zkřížená reaktivita s lidskou genomovou DNA. Lidská genomová DNA také při testovaných koncentracích neinterferovala s kontrolou CIC.

Interferující látky

V neklinické studii bylo pomocí kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert hodnoceno 26 potenciálně interferujících látek, včetně tří mikroorganismů, které mohou být přítomny ve vzorcích moče.

Pro stanovení, zda přítomnost potenciálně interferujících látek způsobila interferenci při testu, bylo testováno osm replikátů negativních a osm replikátů pozitivních vzorků na látku. Roztoky potenciálně rušivých látek byly připraveny a testovány při koncentracích uvedených v tabulce 7 nebo vyšších. Tabulka 7 uvádí maximální tolerovanou koncentraci pro každou látku. Všechny vzorky byly přidány do stejného objemu činidla pro transport moči Xpert a potom spojeny, aby se vytvořily negativní i pozitivní zásobní roztoky. Potenciálně interferující látky a mikroorganismy byly poté zředěny do negativních a pozitivních souborů pro testování.

Účinek každé potenciálně rušivé látky na pozitivní a negativní replikáty byl vyhodnocen porovnáním LDA v přítomnosti potenciálně inhibiční látky s LDA kontrol, kterým tato látka chyběla.

Z 26 potenciálně rušivých látek způsobily výsledky testu INVALID dva mikroorganismy, *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 6^8 CFU/ml a *Candida albicans* v koncentraci 6^7 CFU/ml. Výsledky testu ERROR způsobily dvě látky, nitrofurantoin (75 mg/dl) a fenazopyridin-HCl (při 33,75 mg/dl). Šest látek způsobilo statisticky významné inhibiční účinky na celkové LDA, které bylo o více než dvě standardní odchylky od kontrolního průměru: albumin (při 3 g/dl), hemoglobin (při 1,2 g/dl), *Escherichia coli* (při 6^6 CFU/ml), bilirubin (při 15 mg/dl), *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (při $2,2^7$ CFU/ml) a plná krev (při 1,5 %). U těchto látek byly provedeny titrace a byly stanoveny maximální tolerované koncentrace, které jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7. Testované látky a maximální tolerované koncentrace

Analyt	Koncentrace*	
	(SI jednotky)	(Konv. jednotky)
Možné složky moči		
Albumin	30 g/l	1,92 g/dl
Kyselina askorbová (vitamín C)	342 µmol/L	6 mg/dl
Bilirubin (nekonjugovaný)	192,4 µmol/l	11,25 mg/dl
Kofein	308 µmol/L	598 µg/l
Ethanol	21,7 mmol/l	100 mg/dl
Glukóza	6,7 mmol/l	120 mg/dl
Hemoglobin	12 g/l	0,153 g/dl
Leukocyty	n/a	1 ⁵ /ml
Kyselina močová	0,5 mmol/l	9 mg/dl
Chlorid sodný	128,3 mmol/l	750 mg/dl
Nikotin	6,2 µmol/l	100,6 µg/dl
Pná krev	n/a	1 % v/v

Tabulka 7. Testované látky a maximální tolerované koncentrace (pokračování)

Analyt	Test	
	(SI jednotky)	(Konv. jednotky)
Možné složky moči		
Možné mikrobiální kontaminanty		
<i>Candida albicans</i>	n/a	6 ⁶ CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	n/a	6 ⁵ CFU/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n/a	6 ⁷ CFU/ml
Terapeutické látky		
Acetaminophen	199 µmol/l	30 µg/ml
Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	n/a	1 ⁶ CFU/ml
Doxycyklin	67,5 µmol/l	3 mg/dl
Mitomycin C	448,7 µmol/l	15 mg/dl
Kyselina acetylsalicylová	3,62 mmol/l	65,2 mg/dl
Thiotepa	1,7 mmol/l	32,6 mg/dl
Ampicilin	152 µmol/l	1,72 mg/dl
Doxorubicin-HCl	1,1 mmol/l	64,3 mg/dl
Nitrofurantoin	2,5 mmol/l	60 mg/dl
Fenazopyridin-HCl	1,0 mmol/l	25,32 mg/dl
Trimethoprim	2,1 mmol/l	60 mg/dl
* Koncentrace pro nekonzervovanou (čistou) moč		

Křížová kontaminace

Byla provedena studie, která prokázala, že samostatné zásobní kazety GeneXpert na jedno použití minimalizují kontaminaci přenosem z vysoce pozitivních vzorků do následných negativních vzorků probíhajících ve stejném modulu GeneXpert. Studie spočívala v negativním vzorku zpracovaném ve stejném modulu GeneXpert bezprostředně po vzorku vysoce pozitivního karcinomu močového měchýře. Vysoce pozitivní vzorek sestával z buněčných linií SW780 (ATCC® CRL-2169) při 1,5⁵ buněk/ml a BE(2) -c (ATCC® CRL-2268) při 2,5⁴ buněk/ml, v 50 % transportního činidla a v 50 % syntetické moči. Schéma testování bylo opakováno 43× s použitím jediného modulu GeneXpert pro celkem 21 vysoce pozitivních a 22 negativních vzorků. Všech 21 vysoce pozitivních vzorků bylo správně nahlášeno jako POZITIVNÍ. Dvacet jedna negativních vzorků bylo správně nahlášeno jako NEGATIVNÍ a jeden negativní vzorek byl uveden jako INVALID, protože hodnota Ct CIC byla mimo platný rozsah.

Reproducibilita testu

Reproducibilita detekce rakoviny močového měchýře kitem Xpert byla hodnocena za použití panelu 5 vzorků připravených v základní matici 50 % transportního činidla Xpert a 50 % moči. Dva operátoři na každém ze tří studijních míst testovali jeden panel pěti vzorků během devíti testovacích dnů (pět vzorků × devět dnů × dva operátoři × dva replikáty × tři místa). Na každém ze tří testovacích míst byly použity tři šarže kazet pro detekci rakoviny močového měchýře Xpert. Detekce rakoviny močového měchýře Xpert byla provedena podle doporučeného postupu kitu pro sledování rakoviny močového měchýře Xpert. Reprodukovatelnost detekce rakoviny močového měchýře kitem Xpert byla hodnocena z hlediska LDA pro každý vzorek, relativně k očekávaným hodnotám. Průměrná směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV) mezi místy, mezi šaržemi, mezi dny, mezi operátory a v rámci zkoušek pro každého člena panelu jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Souhrn dat týkajících se reproducibility testu

Očekávané LDA Celkem	Skutečné (95 % CI)	N	Místo		Šarže		Den		Operator/ run		V rámci runu		Celkem	
			SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	CV
-0.01	0.00 (-0.03, 0.03)	108	0.00	0.00	0.01	44.3	0.00	0.0	0.00	0.0	0.01	55.7	0.02	19.06
0.32	0.35 (0.16, 0.54)	108	0.00	0.00	0.04	16.8	0.03	12.7	0.02	6.0	0.08	64.5	0.10	0.28
0.57	0.60 (0.47, 0.73)	108	0.00	0.00	0.04	47.7	0.01	2.8	0.00	0.0	0.05	49.5	0.06	0.11
0.62	0.69 (0.49, 0.89)	108	0.00	0.00	0.06	35.7	0.00	0.0	0.04	16. 2	0.07	48.1	0.10	0.15
1.27	1.28 (1.13, 1.43)	108	0.00	0.00	0.07	72.0	0.00	0.1	0.00	0.0	0.04	27.9	0.08	0.06

% - Je příspěvek složky rozptylu do celkového CV.

Reference

1. Burger M et al, Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. Eur Urol 63 (2013) 234-241.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. CA: Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
3. Hollenbeck BK, Dunn RL, YeZ, Hollingsworth JM, Skolarus TA, Kim SP, Montie JE, Lee CT, Wood DP Jr, Miller DC. Delays in diagnosis and bladder cancer mortality. Cancer 2010, 116(22):5235-42.

Umístění centrály Cepheid

Sídlo společnosti	Evropské sídlo
Cepheid 904 Caribbean Drive Sunnyvale, CA 94089 USA	Cepheid Europe SAS Vira Solelh 81470 Maurens- Scopont France
Telephone: +1 408.541.4191	Telephone: +33 563 825 300
Fax: +1 408.541.4192	Fax: +33 563 825 301
www.cepheid.com	www.cepheidinternational.com

Technická podpora

Před kontaktováním technické podpory společnosti Cepheid shromážděte následující informace:

- Jméno výrobku
- Číslo šarže
- Sériové číslo přístroje
- Chybové zprávy (pokud existují)
- Verze softwaru a případně číslo servisní značky počítače

Mgr. Jiří Smutný

Aplikační specialista molekulární biologie

E-mail: smutny@biovendor.cz

Tel.: +420 601 394 077

Kontaktní informace pro další kanceláře společnosti Cepheid jsou k dispozici na našich webových stránkách www.cepheid.com nebo www.cepheidinternational.com na kartě PODPORA.