

Formação sobre o ensaio: Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

*Formação técnica apenas
para produtos CE-IVD*



Agenda da formação

- Xpert Breast Cancer STRAT4 Formação
 - Aplicação clínica
 - Reagentes
 - Conservação e manuseamento do kit
 - Precauções
 - Preparação da amostra
 - Preparação do cartucho
 - Controlo de qualidade
 - Análise dos resultados





Objetivos da formação

No final da formação, o utilizador será capaz de:

- Conservar e manusear o kit do cartucho Xpert Breast Cancer STRAT4
- Conservar e manusear o Xpert FFPE Lysis Kit
- Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório
- Processar e transportar amostras
- Realizar a preparação do cartucho e executar o ensaio
- Comunicar os vários resultados gerados pelo software
- Compreender a estratégia de controlo do ensaio

Cancro da mama



Factos sobre o cancro da mama:

- O cancro da mama é um dos cancros mais comuns em mulheres a nível mundial.
- É a causa mais frequente de mortalidade por cancro em mulheres nos países em vias de desenvolvimento.
- É a segunda causa mais frequente de mortalidade por cancro (a seguir ao cancro do pulmão) em mulheres em países desenvolvidos.
- A mortalidade por cancro da mama diminuiu 34% desde 1990 em grande parte devido à melhoria do tratamento e à deteção precoce.

Referências

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.

O que é o cancro da mama?

- O cancro da mama ocorre principalmente nos ductos e glóbulos mamários
- O cancro da mama pode ser classificado em quatro subtipos moleculares intrínsecos que fornecem informações preditivas e de prognóstico
 - Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e Triplo Negativo (Basal)
- A seleção do primeiro regime terapêutico é determinada pela expressão de quatro biomarcadores
 - Recetor de estrogénio (ER [proteína] ou ESR1 [ARNm]), recetor de progesterona (PR [proteína] ou PGR [ARNm]), recetor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 [proteína] ou ERBB2 [ARNm]), marcador de proliferação Ki-67 (Ki67 [proteína] ou MKi67 [ARNm])
 - Procedimentos padrão para a caracterização inicial de todas as doentes com cancro da mama
 - Os biomarcadores são fatores preditivos e de prognóstico
- Os atuais métodos de medição de biomarcadores incluem:
 - Imuno-histoquímica (IHC) para avaliar a expressão de proteínas
 - Hibridação fluorescente in situ (FISH) para detetar a amplificação de gene (apenas HER2)

Referências

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.

A necessidade:

- Tempo de retorno (TAT) mais rápido
 - Atualmente, o tempo de retorno dos resultados é de dias. A redução do tempo de espera até ao início do tratamento em mulheres recentemente diagnosticadas com cancro da mama é uma vantagem para o GX.
- Um procedimento mais padronizado, menos subjetivo e muito mais fácil de realizar
 - Os resultados de imuno-histoquímica (IHC) e a coloração por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) podem ser subjetivos e difíceis de padronizar nos vários laboratórios. Para a IHC, nem todos os anticorpos são criados iguais.
- Alternativa mais económica
 - O equipamento e os reagentes de coloração podem ser dispendiosos
- Melhoria das opções para o tratamento das doentes
 - Permite a realização de testes laboratoriais mais próximos do doente e a obtenção de resultados mais rápidos
 - Permite aos patologistas controlar diversos aspetos dos testes, ao mesmo tempo que reduz a necessidade de testes em laboratórios de referência
 - É provável que represente a única solução viável para as doentes de países em desenvolvimento, onde a IHC é um procedimento muito difícil e dispendioso. A FISH não está disponível em todos os doentes de países em desenvolvimento.

A Solução:

- Capacita o patologista
 - Otimização da equipa do laboratório - altamente reproduzível, utilização e formação fáceis
 - O ensaio pode ser realizado em laboratórios clínicos ou de histologia
- Menor subjetividade em comparação com a IHC
 - Excelente concordância com padrões reconhecidos – 90% de concordância global em todos os 4 marcadores.
 - Produção contínua sem resultados ambíguos
 - Resultados fáceis de interpretar
- Possível melhoria do fluxo de trabalho
 - Resultados úteis – TAT mais rápido, em ~2 horas
 - Acesso aleatório efetivo
- Procedimento de lise simplificado para FFPE
 - Um kit convenientemente embalado e fácil de utilizar
- Controlos externos disponíveis no mercado*

A solução Cepheid



- Medição de quatro ARNm-alvos (ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67).
- O gene de referência da proteína 1 citoplasmática de interação com FMR1 (CYFIP1) funciona como controlo de adequação da amostra, sendo utilizado para normalizar os níveis de expressão de ARNm.
- Simples e fácil de utilizar
- O sistema de cartucho fechado minimiza o risco de contaminação
- 3 controlos internos para cada amostra
 - Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
 - Controlo interno da Cepheid (CIC)
 - Controlo de adequação da amostra (SAC)

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4



Utilização prevista*

O Xpert Breast Cancer STRAT4 é um ensaio semiquantitativo baseado na reação em cadeia da polimerase com valores de cut-off qualitativos para os ARNm do recetor de estrogénio (ESR1), do recetor de progesterona (PGR), do recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ERBB2) e do marcador de proliferação Ki-67 (MKi67) isolados de tecido de cancro da mama invasivo fixado com formalina e embebido em parafina (FFPE). O ARN é extraído de uma área enriquecida com tumor a partir de um corte de tecido microscópico, conforme identificado por um patologista. O teste destina-se a ser utilizado juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais para classificar tecidos de cancro mamário quanto ao estado do recetor de hormonas, o estado do recetor HER2 e o estado do marcador de proliferação. O teste destina-se a ser utilizado com o sistema GeneXpert®, que inclui o isolamento de ARN a partir de tecidos FFPE, assim como a amplificação e a deteção de sequências-alvo dentro do cartucho.

O ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4 não se destina a ser:

- um fator de previsão da gravidade da doença
- um dispositivo autónomo de teste de diagnóstico do cancro da mama
- um fator de prognóstico para recidiva da doença

Indicações de utilização: O teste destina-se a ser utilizado na avaliação dos níveis de ARNm de ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 em tecidos de cancro mamário invasivo provenientes de doentes e preparados como amostras de FFPE, e a auxiliar na avaliação clínica juntamente com outros dados laboratoriais.

*CE-IVD. Dispositivo médico para utilização in vitro.

Requisitos do sistema e de reagentes

Sistemas GeneXpert

- Instrumento GeneXpert de 6 cores
- Software GeneXpert versão 4.7b ou posterior
- Software Xpertise versão 6.4b ou posterior

Kits de teste (CE-IVD)

- GXBCSTRAT4-CE-10

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Kit de lise Xpert® FFPE, Referência GXFFPE-LYSIS-CE-10
- Etanol $\geq 95\%$
- Agitador de vórtice
- Pipetas e pontas de pipeta com filtro para aerossóis para pipetar 5, 20, 260, 520 e 1200 μL
- Bloco de aquecimento a 80 °C que acomoda tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Microcentrifuga para centrifugar tubos de microcentrifuga de 1,5 mL

Componentes do kit Xpert Breast Cancer STRAT4

	Xpert Breast Cancer STRAT4
Número de catálogo	GXBCSTRAT4-CE-10
Testes por kit	10
Conteúdo por cartucho de teste	Esferas de reagente
	Reagentes de eluição e enxaguamento
CD do kit	Ficheiro de definição do ensaio (ADF) - .gxa
	Instruções de importação do ensaio
	Folheto informativo (PDF)
	Ficheiro de relatório do software ONCore - .onc
Conservação	2 °C–28 °C



Os cartuchos contêm substâncias químicas perigosas - consultar o folheto informativo e a ficha de dados de segurança para obter informação mais detalhada.

Componentes do Xpert FFPE Lysis Kit

	Xpert FFPE Lysis Kit
Número de catálogo	GXFFPE-LYSIS-CE-10
Testes por kit	10
Tubos de lise (1,5 mL)	10
Frascos de amostra (5 mL)	10
Reagente de lise FFPE	13 mL
Proteinase K (PK)	250 µL
Conservação	2 °C–28 °C



Os kits contêm substâncias químicas perigosas - consultar o folheto informativo e a ficha de dados de segurança para obter informação mais detalhada.

Boas Práticas de Laboratório

Configuração do laboratório de PCR

- Preparação do cartucho/reagente (Cartridge/reagent preparation) → Adição da amostra (Sample addition) → Detecção (Detection)

Conservação de amostras e reagentes

- Conserve as amostras separadamente dos reagentes para impedir a contaminação do reagente.

Equipamento

- Utilize pontas de pipeta com filtro, quando necessário.
- Seguir a recomendação do fabricante relativamente à calibração e manutenção do equipamento de laboratório.



Boas Práticas de Laboratório (cont.)

Limpeza

- Limpe as superfícies de trabalho com uma diluição 1:10 de lixívia* doméstica em água, seguida de uma solução de etanol a 70%. Secar completamente as superfícies de trabalho com um pano.

Pessoal

- Usar batas limpas e luvas.
- Trocar de luvas entre o processamento de amostras.

Área da bancada de laboratório

- Limpar a área da bancada de laboratório por rotina.
- Manter a parte traseira do instrumento sem pó.

* A concentração de cloro ativo final deve ser de 0,5%, independentemente da concentração da lixívia doméstica usada no seu país



Conservação e manuseamento do Xpert Breast Cancer STRAT4 e do Kit de lise FFPE

- Conservar os kits de teste entre 2 °C e 28 °C.
- Não utilizar cartuchos fora do prazo de validade.
- Cada cartucho de utilização única é utilizado para processar um teste. Não reutilizar cartuchos processados.
- Não abrir um cartucho até que esteja pronto para testar.
 - Iniciar o teste dentro de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.
 - A estabilidade no instrumento Infinity é de 6 horas.
- A contaminação cruzada durante as etapas de manuseamento de amostras deve ser evitada.
 - Trocar de luvas entre as amostras.
- Não utilize um cartucho que tenha caído ou sido agitado.
 - Agitar ou deixar cair o cartucho após a abertura da respetiva tampa pode produzir resultados inválidos.
- Não utilizar um cartucho que tenha um tubo de reação danificado.
- Não utilizar um cartucho com fuga.
- Não substitua por outros reagentes.
- Não utilize um cartucho cujo conteúdo tenha ficado turvo ou descolorado.



Advertências e precauções:

- Manuseie todas as amostras e kits de reagentes empregando técnicas adequadas para prevenir ou minimizar contaminação com RNase e/ou DNase.
- Não reutilize lâminas para macrodissecção, pontas de pipeta ou tubos/frascos para evitar contaminação cruzada durante o manuseamento da amostra.
- A remoção incompleta (raspagem) da área do tumor da lâmina para preparação do lisado de FFPE pode resultar em material insuficiente para o ensaio e, por conseguinte, uma taxa indeterminada/INVÁLIDA (INVALID) superior ao previsto.
- Trate todas as amostras biológicas, incluindo cartuchos usados, com as precauções normais.
- O tecido FFPE tem de ser tratado com o Xpert FFPE Lysis Kit.
- Use luvas de proteção descartáveis, batas e proteção ocular durante o manuseamento de amostras e reagentes.
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas.

Preparação de amostra



Requisitos de tecido FFPE

- Podem ser utilizadas secções de tecido FFPE ou tiras de tecido não coradas.
- Siga as orientações ASCO/CAP para preparação de tecido FFPE.
- As amostras devem ter sido fixadas apenas em formalina tamponada neutra (NBF) a 10% durante 6 a 72 horas.
- O lisado de FFPE deve preparar-se a partir do bloco de tumor FFPE com a maior área de carcinoma mamário adequado (um mínimo de 30% de celularidade do tumor).
- Se for necessária macrodissecção, utilize uma lâmina corada com H&E adjacente proveniente do bloco do tumor FFPE como guia para marcar a lâmina não corada.
- Para amostras de tumor com menos de 10 mm² com menos de 30% de tumor, pode ser necessário utilizar o procedimento de lisado concentrado ou mais do que um corte de 4 µm-5 µm para resultados válidos.
- Alguns tecidos FFPE com idade superior a 10 anos poderão não ter qualidade suficiente para análise com GeneXpert (o ARN degrada-se ao longo do tempo, mesmo em tecidos FFPE).

Preparação da lâmina/tira (cont.)

1. Corte duas secções de tecido e coloque cada uma em lâminas de vidro separadas.
2. Realize a coloração de uma lâmina com H&E.
3. O patologista examina a lâmina com H&E para demarcar áreas tumorais e não tumorais.
4. Se existirem áreas tumorais (>30% e sem DCIS), pode ser utilizada a totalidade da secção da segunda lâmina. Em alternativa, pode ser macrodissecada para remover áreas específicas para serem testadas.



Tecido FFPE



Imagem de Thomas Sherwood



Imagem de Cepheid

Instruções de raspagem

Rotule um tubo de lise de 1,5 mL (fornecido) para cada amostra que será processada.

- Se não for necessária macrodissecção:
 - Utilizando uma lâmina de corte nova ou um bisturi novo para cada amostra de tecido que será processada, retire (raspe) completamente da lâmina a secção de tecido do tumor invasivo e transfira para o tubo de lise de 1,5 mL rotulado.
- Se for necessária macrodissecção:
 - Examine a lâmina corada com H&E (patologista).
 - Identifique (e delimite) a área do tumor selecionada para testar. Consulte o folheto informativo do ensaio Xpert relativamente ao número necessário de lâminas ou ao requisito mínimo de celularidade do tumor.
 - Delimite a área do tumor que será utilizada para o ensaio na parte de trás da(s) lâmina(s) não corada(s), alinhando-a com a lâmina corada com H&E correspondente e transpondo a área delineada.
 - Realize a macrodissecção (patologista ou técnico).
 - Utilizando uma lâmina de corte nova ou um bisturi novo para cada amostra de tecido que será processada, retire (raspe) completamente da lâmina o tecido delimitado do tumor invasivo (veja a Figura 1) e transfira para o tubo de lise de 1,5 mL rotulado.

Figura 1: Exemplos de remoção correta (recomendada) e incorreta (não recomendada) de tecido da lâmina

Lâmina corada com H&E para referência



Não recomendada (remoção de tecido insuficiente)



Recomendada



Imagens de Cepheid

Cartão de preparação de lisado Xpert FFPE

Preparação do lisado Xpert® FFPE* *FFPE - fixado em formalina e embebido em parafina

Consulte as instruções detalhadas, precauções e advertências no folheto informativo.

Para obter uma cópia da FDS, visite www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

Assistência Técnica da Cepheid
Filial nos EUA
(888) 838-3222, opção 2
techsupport@cepheid.com
Delegação na Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheid.com



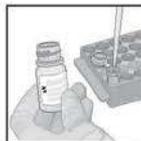
- 1 Raspe uma secção de tecido ou efetue uma macrodissecção da lâmina.



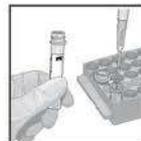
- 2 Transfira o tecido para o tubo de 1,5 mL fornecido.



- 3 Adicione 1,2 mL de reagente de lise FFPE ao tubo de 1,5 mL que contém o tecido FFPE.



- 4 Adicione 20 µL de proteínase K (PK) ao mesmo tubo de 1,5 mL. Feche a tampa.



- 5 Agite em vórtex numa definição máxima durante 5 segundos.



- 6 Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.



- 7 Proceda à incubação da amostra a 80 °C durante 30 minutos.



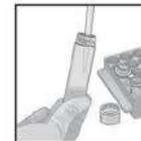
- 8 Agite em vórtex numa definição máxima durante 5 segundos.



- 9 Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.



- 10 Transfira todo o conteúdo para um frasco de amostra de 5 mL fornecido.



- 11 Adicione 1,2 mL de etanol ≥ 95% ao mesmo frasco de amostra de 5 mL.



- 12 Aperte a tampa e agite em vórtex a amostra numa definição máxima durante 15 segundos.



NOTA: O lisado preparado, com etanol, é estável entre 2 °C e 8 °C, durante 1 semana, no máximo. E a ≤ -20 °C durante 4 semanas, no máximo.

Processamento de tecido FFPE

1. Pré-aqueça o bloco de aquecimento a 80 °C.
2. Adicione 1,2 mL de reagente de lise FFPE ao tubo de 1,5 mL que contém a secção/ tira FFPE.
3. Adicione 20 µL de proteinase K (PK) ao mesmo tubo de lise de 1,5 mL.
4. Feche a tampa.
5. Agite em vórtex a amostra continuamente numa definição máxima durante 5 segundos.
6. Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.
7. Proceda à incubação do tubo de lise de 1,5 mL contendo a amostra e o reagente de lise num bloco de aquecimento a 80 °C durante 30 minutos.
8. Agite em vórtex a amostra continuamente numa definição máxima durante 5 segundos.
9. Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.
10. Utilizando uma pipeta, transfira todo o conteúdo (~1,2 mL) para um frasco de amostra de 5 mL fornecido.
11. Rotule o frasco para cada amostra que será processada.
12. Adicione 1,2 mL de etanol ≥ 95% ao mesmo frasco de amostra de 5 mL.
13. Aperte a tampa e agite em vórtex a amostra continuamente numa definição máxima durante 15 segundos.

Transporte e conservação de amostras do Xpert Breast Cancer STRAT4

Amostra	Temperatura de transporte e conservação (°C)	Tempo de conservação
Tira, em tubo de 1,5 mL	2 °C–8 °C	2 semanas
Secção da lâmina	2 °C–8 °C	1 mês
Secções macrodissecadas, em tubo de 1,5 mL	2 °C–8 °C	2 semanas
Lisado preparado, com etanol	2 °C–8 °C	1 semana
	≤ -20 °C	1 mês
	-80 °C	Longo prazo

Cartão de preparação do cartucho Xpert Breast Cancer STRAT4

Preparação do cartucho Xpert® Breast Cancer STRAT4

Consulte as instruções detalhadas, precauções e advertências no folheto informativo.

Para obter uma cópia da FDS, visite www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

Assistência Técnica da Cepheid
Filial nos EUA
(888) 838-3222, opção 2
techsupport@cepheid.com
Delegação na Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheid-europe.com



NOTA: Se a preparação do lisado de FFPE, como descrita no verso deste cartão, acabou de ser concluída, o Passo 2 das instruções que se seguem podem ser ignoradas.

- 1 Obtenha um cartucho e um lisado de FFPE preparado para cada amostra a ser testada.



- 2 Agite em vórtex o lisado de FFPE durante 15 segundos.



- 3 Abra a tampa do cartucho Xpert.



- 4 Pipete 520 µL do lisado preparado do frasco de 5 mL e transfira para a câmara da amostra.



- 5 Feche a tampa do cartucho Xpert.



- 6 Inicie o ensaio dentro do prazo indicado no folheto informativo.

Procedimento do ensaio — Preparação do cartucho

Em caso de utilização de um instrumento GeneXpert Dx

- Inicie o teste no prazo de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.

Em caso de utilização de um instrumento GeneXpert Infinity

- Faça o pedido do teste e coloque o cartucho no tapete rolante no prazo de 30 minutos após a adição da amostra preparada ao cartucho.
- A estabilidade restante no interior do instrumento é controlada pelo software Xpertise® de modo a que os testes sejam executados antes do fim do período de 6 horas no instrumento.



Passos automáticos do teste Xpert Breast Cancer STRAT4





Eliminação de resíduos

- As amostras biológicas, os dispositivos de transferência e os cartuchos usados devem ser considerados como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos, exigindo precauções padrão.
- Sigam os procedimentos relativos a resíduos ambientais da vossa instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos.
- Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as diretrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).

Controlo de qualidade

*Consulte os detalhes completos
no folheto informativo*



Controlo do sistema do instrumento — Estado da verificação

- O controlo do sistema do instrumento verifica o sistema ótico, a temperatura do módulo e a integridade mecânica de cada cartucho.
 - Se os controlos do sistema falharem, há indicação de ERRO (ERROR) para o resultado do teste.



Estratégia de controlo do ensaio Cepheid

- Cada cartucho Xpert constitui um dispositivo de teste autónomo.
 - A Cepheid preparou controlos internos que permitem ao sistema detetar modos de falha específicos em cada cartucho.
 - Controlo dos reagentes: Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
 - Controlo de adequação da amostra: Gene de referencia (CYFIP1)
 - Controlo interno da Cepheid: Armored RNA (CIC)



Controlo de verificação da sonda — PCC (Probe Check Control)

- Após a preparação da amostra, a reconstituição das esferas e o enchimento dos tubos (antes da termociclagem), são efetuadas múltiplas leituras da fluorescência a diferentes temperaturas.
- As leituras são comparadas com os valores predefinidos estabelecidos pela Cepheid.
- A verificação da sonda controla:
 - A ausência de esferas de reagente específico para o alvo (TSR) e/ou de reagente enzimático, que contêm todos os iniciadores, sondas e modelos de controlo interno
 - A reconstituição incompleta do reagente
 - O enchimento incompleto do tubo de reação
 - A degradação da sonda
- Se a verificação da sonda falhar, surge a indicação de ERRO (ERROR) para o resultado do teste.

Controlo de adequação da amostra — SAC

- O controlo de adequação da amostra (SAC) verifica se foram adicionados à câmara de amostra células humanas e ARN humano. O SAC é aprovado se cumprir os critérios de aceitação validados.
- Controlo CYFIP1: Proteína 1 citoplasmática de interação com FMR1
 - Este gene de referência é utilizado para normalizar os níveis de expressão para o ESR1, PGR, ERBB2, e MKi67.
 - Também serve como controlo de adequação da amostra (SAC), assegurando que a amostra contém ARN suficiente.
- É necessário um sinal de CYFIP1 mínimo para se obter um resultado de teste válido.
- Um SAC negativo pode dever-se a:
 - ARN insuficiente
 - Colheita incorreta da amostra
 - Lise ineficiente da amostra
 - Mistura insuficiente da amostra
- Se o SAC falhar numa amostra negativa para o analito, surge a indicação de INVÁLIDO (INVALID) para o resultado do teste.

Controlo interno da Cepheid — CIC

- O controlo interno da Cepheid (CIC) assegura que a amostra foi corretamente processada.
- O CIC consiste em Armored RNA[®].
- Verifica se a reação de RT-PCR prosseguiu com inibição mínima.

Controlos externos STRAT4*

Fornecedor	Nome do controlo	Descrição	configuração	Temp. de conservação
Horizon DX** www.horizondiscovery.com	STRAT4 FFPE Control A	ESR1 POSIT. (ESR1 POS) PGR POSIT. (PGR POS) ERBB2 NEGAT. (ERBB2 NEG) MKi67 POSIT. (MKi67 POS)	Lâminas com secção	4 °C
	STRAT4 FFPE Control B	ESR1 POSIT./NEGAT. (ESR1 POS/NEG) PGR POSIT. (PGR POS) ERBB2 POSIT. (ERBB2 POS) MKi67 POSIT./NEGAT. (MKi67 POS/NEG)	Lâminas com secção	4 °C
	STRAT4 FFPE Control C	ESR1 NEGAT. (ESR1 NEG) PGR NEGAT. (PGR NEG) ERBB2 NEGAT. (ERBB2 NEG) MKi67 POSIT./NEGAT. (MKi67 POS/NEG)	Lâminas com secção	4 °C

*Ainda estão a ser desenvolvidos controlos externos.

** Fornecedor alternativo: ATCC

Tenha em atenção que no caso de amostras negativas, a ausência de células humanas resultará em INVÁLIDO (INVALID)

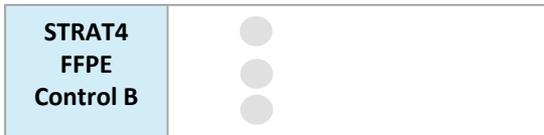
Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estaduais e federais, conforme aplicável

Configuração do controlo externo FFPE STRAT 4

	O controlo Xpert Breast Cancer STRAT4 FFPE		
Alvos	STRAT4 FFPE Control A	STRAT4 FFPE Control B	STRAT4 FFPE Control C
ESR1	posit. (pos)	posit. (próximo da definição de cut-off) (pos [close to cutoff])	negat. (neg)
PGR	posit. (pos)	posit. (pos)	negat. (neg)
ERBB2	negat. (neg)	posit. (pos)	negat. (neg)
MKi67	posit. (pos)	posit. (próximo da definição de cut-off) (pos [close to cutoff])	posit. (pos)



Imagem de Cepheid



Embalagem:
Controlos FFPE, Instruções, Certificado de análise

Análise dos resultados

*Consulte os detalhes completos
no folheto informativo*



Resultados

- O Xpert Breast Cancer STRAT4 apresenta um resultado de teste POSITIVO (POSITIVE) ou NEGATIVO (NEGATIVE) para cada alvo.
- O relatório final apresenta o resultado individual de cada alvo.
- Um alvo é considerado positivo quando apresenta sobre-expressão do ARNm em relação ao gene de referência.
- Para obter um resultado válido de ESR1 e ERBB2, o controlo CYFIP1 tem de indicar APROVADO (PASS).
- Para obter um resultado válido de PGR e MKi67, o controlo CYFIP1 tem de indicar APROVADO (PASS) e o CYFIP1 alternativo tem de indicar POSITIVO (POS).
- Se o CYFIP1 alternativo for NEGATIVO (NEG), o resultado de PGR e MKi67 será Indeterminado (Indeterminate).

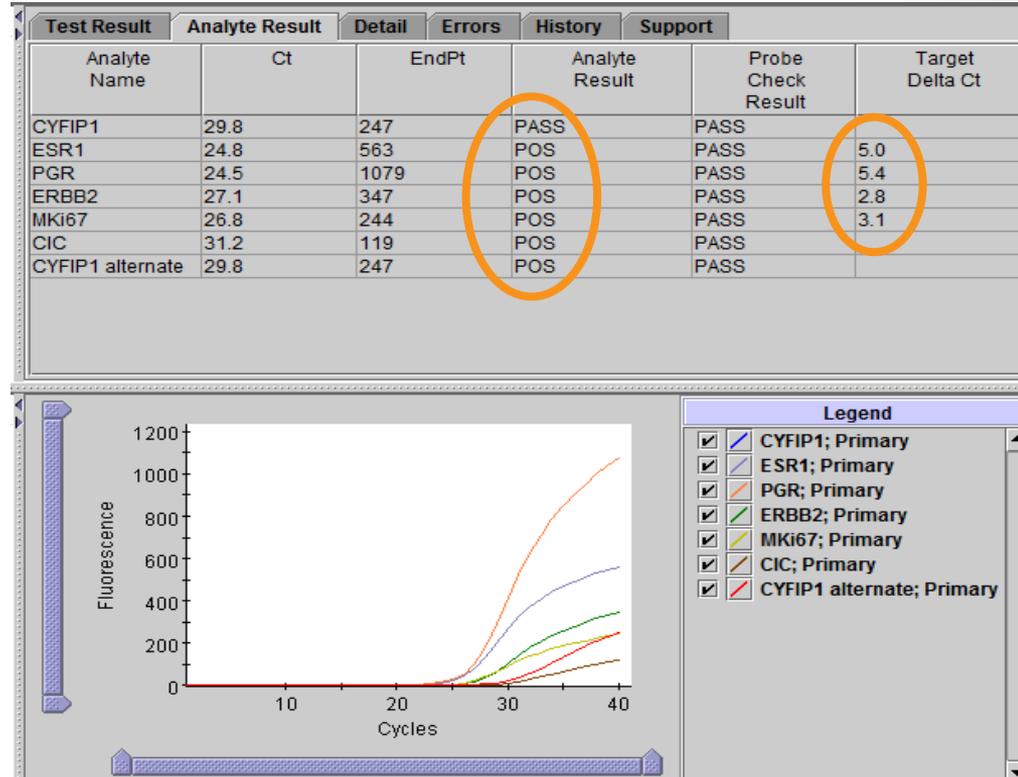
Sumário dos resultados

Resultado apresentado	CYFIP1	CYFIP1 alternativo	CIC
ESR1 POSITIVO (ESR1 POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
ESR1 NEGATIVO (ESR1 NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
PGR POSITIVO (PGR POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
PGR NEGATIVO (PGR NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT. (POS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
ERBB2 POSITIVO (ERBB2 POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
ERBB2 NEGATIVO (ERBB2 NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
MKi67 POSITIVO (MKi67 POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
MKi67 NEGATIVO (MKi67 NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT. (POS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
PGR INDETERMINADO (PGR INDETERMINATE)	APROVADO (PASS)	NEGAT. (NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
MKi67 INDETERMINADO (MKi67 INDETERMINATE)	APROVADO (PASS)	NEGAT. (NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
REPETIR TESTE (REPEAT TEST)	APROVADO (PASS)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)	NEGAT. (NEG)
INVÁLIDO (INVALID)	FALHOU (FAIL)	NEGAT. (NEG)	POSIT./NEGAT. (POS/NEG)
ERRO (ERROR)	SEM RESULTADO (NO RESULT)	SEM RESULTADO (NO RESULT)	SEM RESULTADO (NO RESULT)
SEM RESULTADO (NO RESULT)	SEM RESULTADO (NO RESULT)	SEM RESULTADO (NO RESULT)	SEM RESULTADO (NO RESULT)

POSITIVO (POSITIVE)

Test Result
ESR1 POSITIVE;
PGR POSITIVE;
ERBB2 POSITIVE;
MKi67 POSITIVE

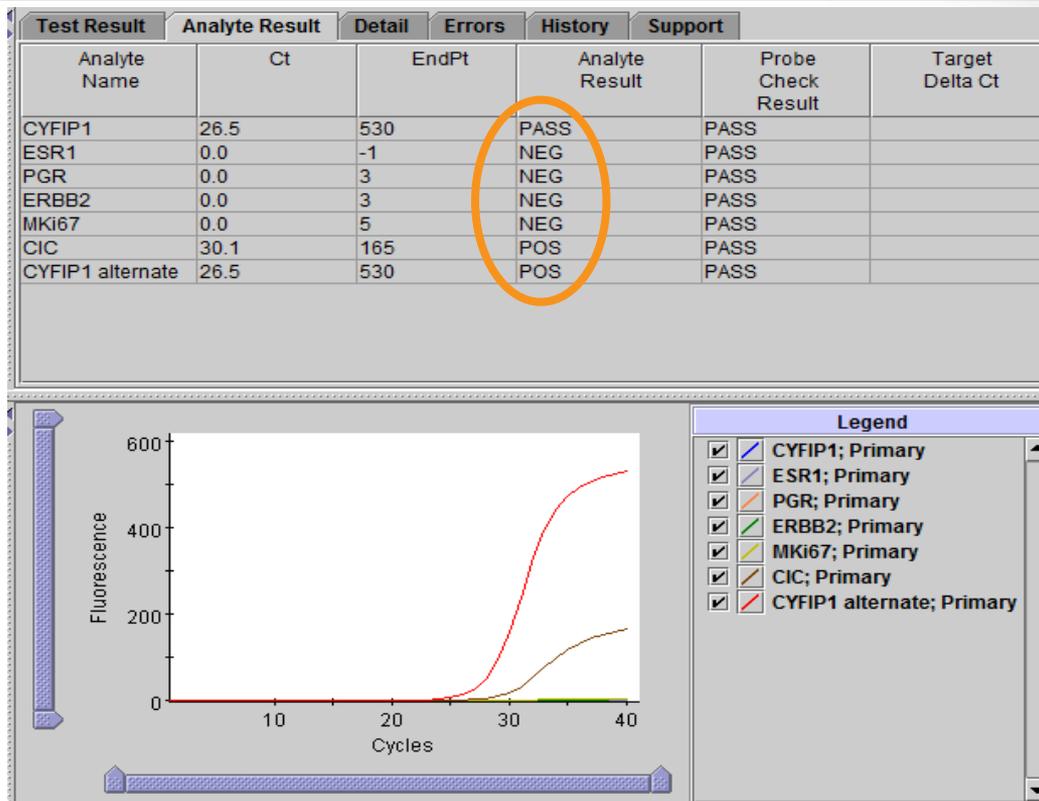
- O transcrito de ARNm-alvo apresenta sobre-expressão e tem um delta Ct acima da definição de cut-off
- CYFIP1 APROVADO (CYFIP1 PASS); o transcrito de ARNm tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar
- PCC APROVADO (PCC PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados



NEGATIVO (NEGATIVE)

Test Result
ESR1 NEGATIVE;
PGR NEGATIVE;
ERBB2 NEGATIVE;
MKi67 NEGATIVE

- O transcrito de ARNm-alvo não apresenta sobre-expressão e tem um delta Ct abaixo da definição de cut-off.
- CYFIP APROVADO (CYFIP PASS); o transcrito de ARNm tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint superior à definição do limiar.
- PCC APROVADO (PCC PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados

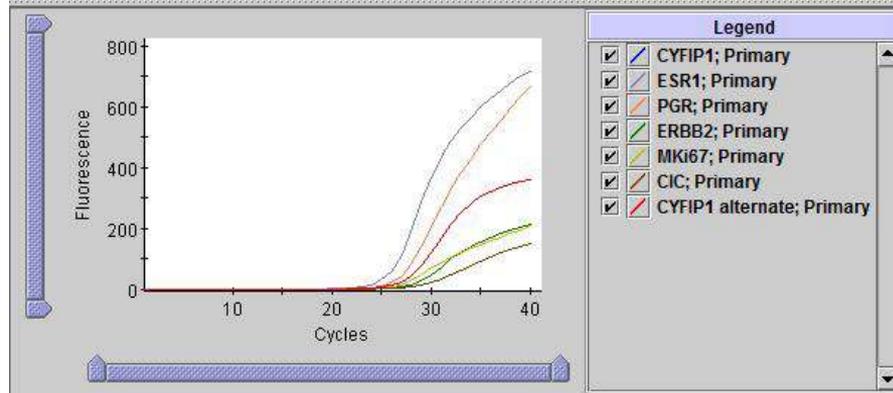


Resultados mistos

- O alvo é positivo ou negativo para a sobre-expressão do ARNm em relação ao gene de referência.
- O transcrito de ARNm do CYFIP1 tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar
- PCC APROVADO (PCC PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados

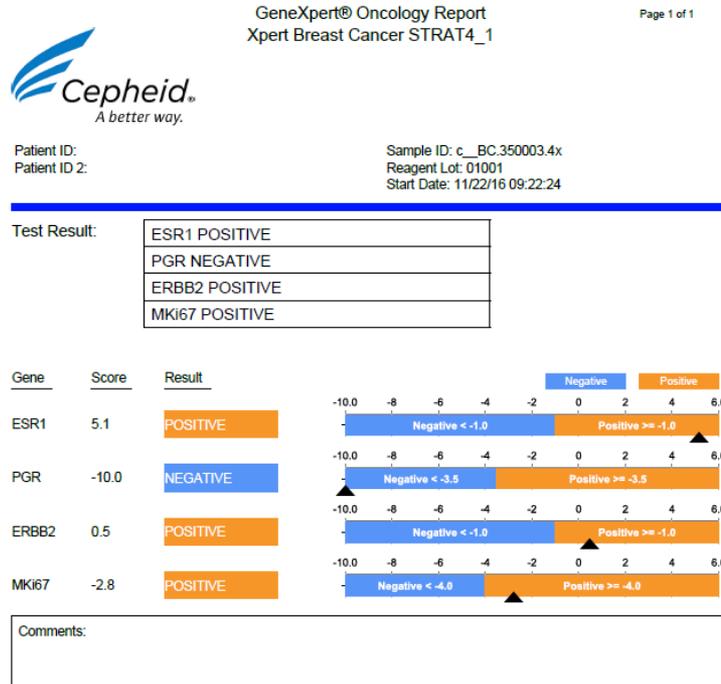
Test Result
ESR1 POSITIVE;
PGR POSITIVE;
ERBB2 NEGATIVE;
MKi67 POSITIVE

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct
CYFIP1	26.8	360	PASS	PASS	
ESR1	24.3	717	POS	PASS	2.5
PGR	25.9	668	POS	PASS	0.8
ERBB2	28.5	214	NEG	PASS	-1.7
MKi67	27.4	206	POS	PASS	-0.7
CIC	29.9	152	POS	PASS	
CYFIP1 alternate	26.8	360	POS	PASS	



Software ONCore

- O software OnCore é instalado no computador do Gx 
- Transforma os resultados do GxDx ou Xpertise num relatório.
- Apresenta uma representação gráfica dos dados.
- Mostra a proximidade do resultado de cada alvo em relação à definição de cut-off.
- Requer um ficheiro .onc exclusivo que está localizado no disco ADF do ensaio





Motivos para repetir o ensaio com lisado concentrado

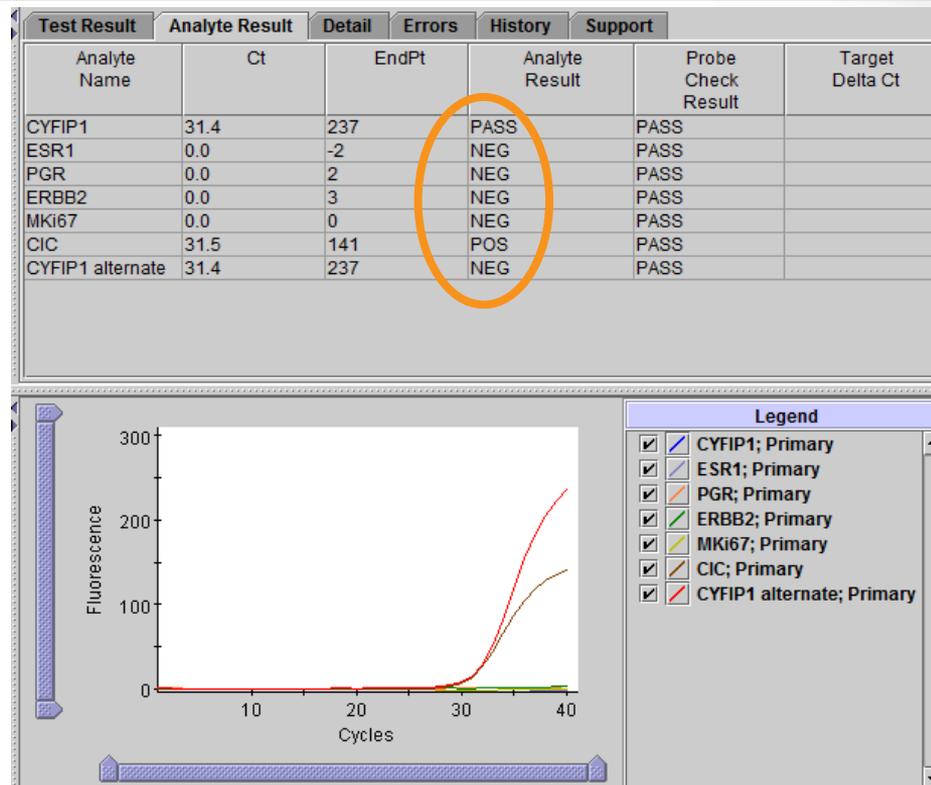
- Um resultado **INDETERMINADO (INDETERMINATE)** indica que a amostra não continha material suficiente para a análise de resultados de **PGR e/ou MKi67**.
- Um resultado **INVÁLIDO (INVALID)** indica que o controlo de referência falhou.
 - A amostra não foi processada adequadamente
 - PCR foi inibida
 - A qualidade do ARN do tumor obtido era inadequada
- Em ambos os casos, repita o teste com um lisado de FFPE mais concentrado.

INDETERMINADO (INDETERMINATE)

Test Result
ESR1 NEGATIVE;
PGR INDETERMINATE;
ERBB2 NEGATIVE;
MKi67 INDETERMINATE

Não é possível determinar os níveis de expressão do ARNm de PGR e/ou MKi67.

- CYFIP1 alternativo – NEGATIVO (NEG); o limiar de ciclo (Ct) não estava dentro do intervalo válido nem o endpoint estava abaixo da definição de limiar
- PCC APROVADO (PCC PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados

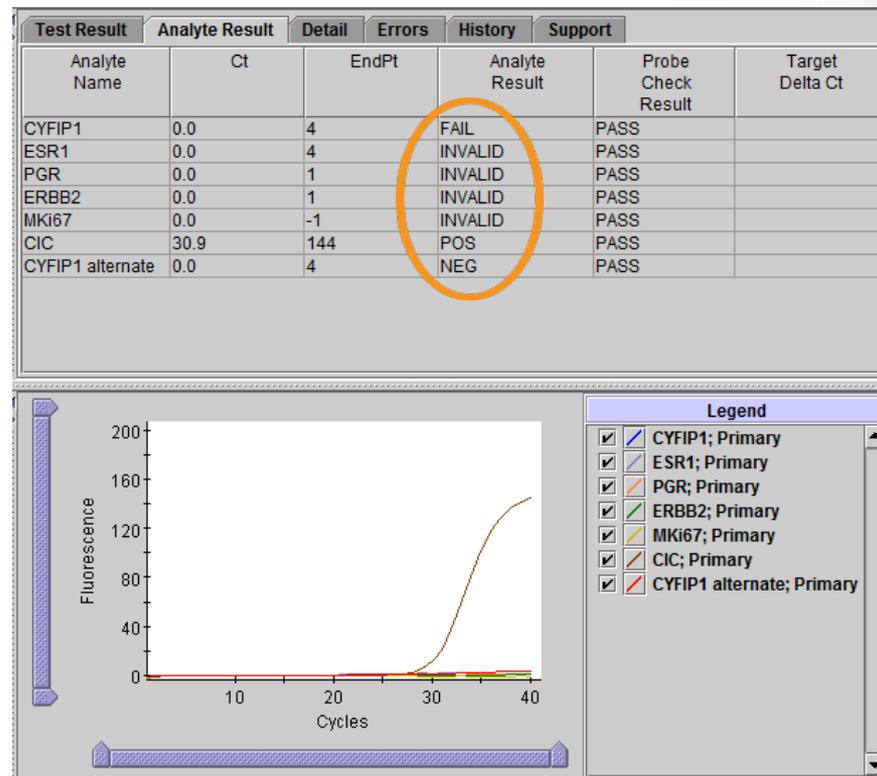


INVÁLIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**

Os níveis de expressão dos mARN-alvo não podem ser determinados.

- CYFIP1 – FALHOU (FAIL) – o limiar de ciclo (Ct) não estava dentro do intervalo válido nem o endpoint estava abaixo da definição de limiar.
- CYFIP1 alternativo - NEGATIVO (NEG)
- PCC APROVADO (PCC PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados



Procedimento de repetição do teste Xpert Breast Cancer STRAT4 - para resultados Indeterminados ou Inválidos

Xpert® Breast Cancer STRAT4 PROCEDIMENTO DE REPETIÇÃO DO TESTE

para resultados Indeterminados (Indeterminate) ou Inválidos (Invalid) – Preparação do lisado de FFPE concentrado

Consulte as instruções detalhadas, precauções e advertências no folheto informativo.

Para obter uma cópia da FDS, visite www.cephheid.com ou www.cephheidinternational.com

Assistência Técnica da Cepheid
Filial nos EUA
(888) 638-3222, opção 2
techsupport@cephheid.com

Delegação na Europa
+33 563 82 53 19
support@cephheid.com



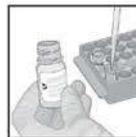
- 1 Raspe uma secção de tecido ou efetue uma macrodissecção da lâmina.



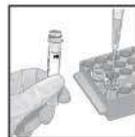
- 2 Transfira o tecido para o tubo de 1,5 mL fornecido.



- 3 Adicione 260 µL de reagente de lise FFPE ao tubo de 1,5 mL que contém o tecido FFPE.



- 4 Adicione 5 µL de protease K (PK) ao mesmo tubo de 1,5 mL. Feche a tampa.



- 5 Agite em vórtex numa definição máxima durante 5 segundos.



- 6 Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.



- 7 Proceça à incubação da amostra a 80 °C durante 30 minutos.



- 8 Agite em vórtex numa definição máxima durante 5 segundos.



- 9 Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.



- 10 Adicione 260 µL de etanol ≥ 95% ao mesmo tubo de lise de 1,5 mL.



- 11 Feche a tampa e agite em vórtex a amostra numa definição máxima durante 15 segundos.



- 12 Microcentrifugue brevemente o tubo para remover o líquido da tampa.



NOTA: O lisado preparado, com etanol, é estável entre 2 °C e 8 °C, durante 1 semana, no máximo. E a 5 -20 °C durante 4 semanas, no máximo.



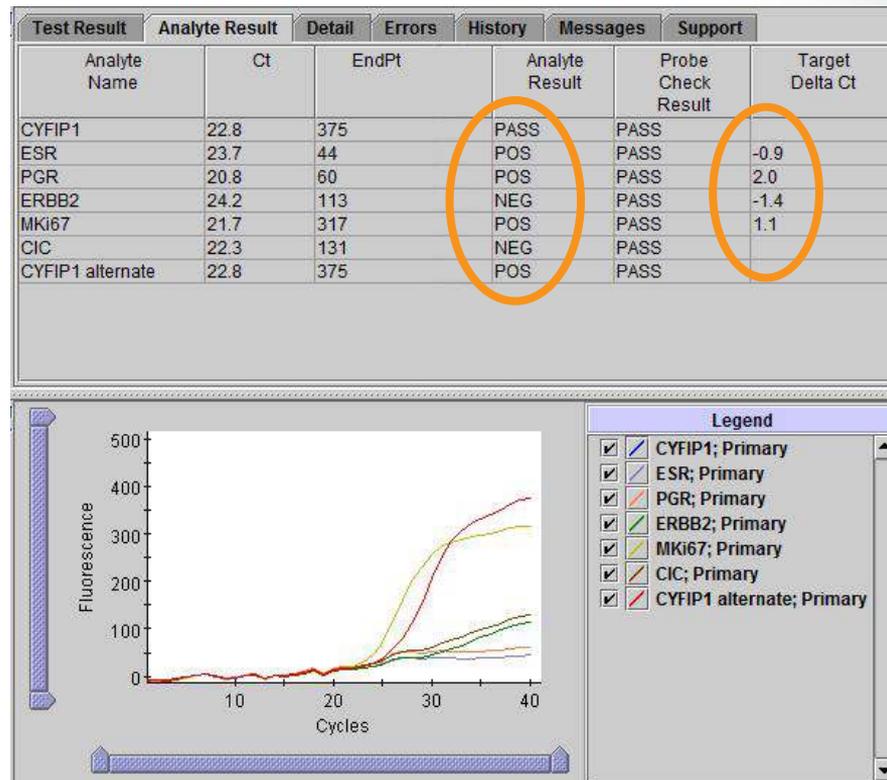
Motivos para repetir o ensaio com lisado guardado

- Um resultado **REPETIR TESTE (REPEAT TEST)** indica que o controlo interno (CIC) falhou. A amostra não foi processada adequadamente.
- Um resultado **ERRO (ERROR)** indica que o controlo de verificação da sonda falhou, possivelmente devido ao tubo de reação não ter sido adequadamente enchido, à deteção de um problema de integridade da sonda de reagente, a terem sido excedidos os limites de pressão máxima, ou ter sido detetado um erro de posicionamento da válvula.
- **SEM RESULTADO (NO RESULT)** indica que foram colhidos dados insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava em curso ou a alimentação elétrica falhou.
- Nestes casos, repita o teste utilizando uma nova alíquota de 520 μ L do mesmo lisado de FFPE guardado.

REPETIR TESTE (REPEAT TEST)

Test Result REPEAT TEST

- Os níveis de expressão dos mARN-alvo não podem ser determinados.
- CIC NEGAT. (CIC NEG); o controlo interno tem um limiar de ciclo (Ct) fora do intervalo válido.

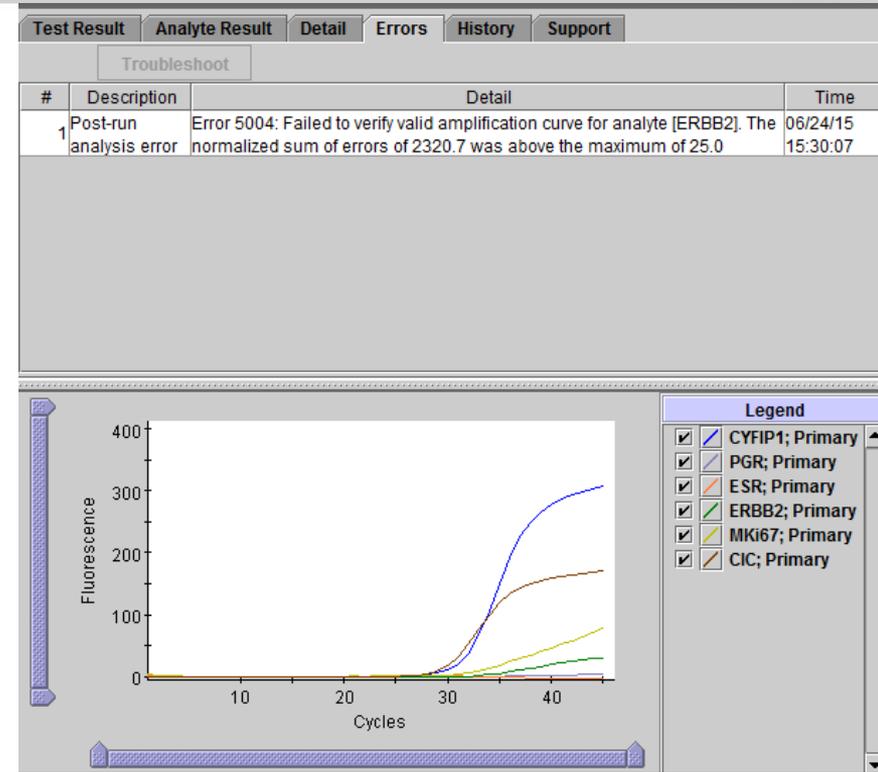


ERRO (ERROR)

Test Result **ERROR**

- Os níveis de expressão dos mARN-alvo não podem ser determinados.
- Verificação da sonda FALHOU (FAIL)*; todos ou um dos resultados de verificação da sonda falharam.

* Se a verificação da sonda foi aprovada, o erro foi causado porque o limite máximo da pressão excedeu o intervalo aceitável, houve um erro de ajuste da curva ou uma falha de um componente do sistema.



SEM RESULTADO (NO RESULT)

Test Result **NO RESULT**

- Os níveis de expressão dos mARN-alvo não podem ser determinados.
- SEM RESULTADO (NO RESULT) indica que os dados colhidos foram insuficientes.
 - Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.
- PCC NA (não aplicável)

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct
CYFIP1	0.0	0	NO RESULT	NA	
ESR1	0.0	0	NO RESULT	NA	
PGR	0.0	0	NO RESULT	NA	
ERBB2	0.0	0	NO RESULT	NA	
MKi67	0.0	0	NO RESULT	NA	
CIC	0.0	0	NO RESULT	NA	
CYFIP1 alternate	0.0	0	NO RESULT	NA	

<No Data Available>

Procedimento de repetição do teste Xpert Breast Cancer STRAT4 - para resultados Sem Resultado, Repetir teste ou Erro

Xpert® Breast Cancer STRAT4 PROCEDIMENTO DE REPETIÇÃO DO TESTE para resultados Sem Resultado (No Result), Repetir teste (Repeat Test) ou Erro (Error)



Consulte as instruções detalhadas, precauções e advertências no folheto informativo.

Para obter uma cópia da FDS, visite www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

Assistência Técnica da Cepheid Filial nos EUA, (888) 838-3222, opção 2 techsupport@cepheid.com

Delegação na Europa +33 563 82 53 19 support@cepheid europe.com

1 Obtenha um novo cartucho e o lisado de FFPE guardado para cada amostra a ser novamente testada.



2 Agite em vórtex o lisado de FFPE durante 15 segundos.



3 Abra a tampa do cartucho Xpert.



4 Pipete 520 µL do lisado guardado do frasco de 5 mL e transfira para a câmara da amostra.



5 Feche a tampa do cartucho Xpert.



6 Inicie o ensaio dentro do prazo indicado no folheto informativo.



Fatores que afetam negativamente os resultados

- **Processamento incorreto da amostra ou do lisado de FFPE**
 - Consulte o folheto informativo para obter informações de preparação do lisado.
 - No caso de ensaios que contenham um controlo SAC, uma amostra que não contenha células humanas origina um resultado inválido se o analito for negativo.
- **Transporte ou conservação incorretos da amostra colhida ou do lisado de FFPE**
 - As condições de transporte e conservação são específicas para cada amostra.
 - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento corretas.
- **Procedimento de análise incorreto**
 - A modificação dos procedimentos de análise pode alterar o desempenho do teste.
 - Erros técnicos ou a troca de amostras podem afetar os resultados do teste.
 - Para se evitarem resultados incorretos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções do folheto informativo.
- **Substância interferente**
 - Podem observar-se resultados falso negativos ou resultados inválidos no ensaio na presença de substâncias que interferem.
- **Número insuficiente de células humanas ou conteúdo tumoral na amostra**

Limitações

- Consulte no folheto informativo uma lista completa das limitações.



Assistência técnica

- A Cepheid presta assistência técnica no local e por telefone, fax e e-mail.
- As informações de contacto para outros escritórios da Cepheid estão disponíveis em <http://www.cepheid.com/support>
 - Selecione a opção Contacte-nos (Contact Us) para obter as informações de contacto
 - Preencha o formulário online para criar um caso de assistência (Create a Support Case)
- Antes de contactar a Assistência Técnica da Cepheid, reúna as seguintes informações:
 - Nome do produto
 - Número de lote
 - Número de série do instrumento
 - Mensagens de erro (se houver alguma)
 - Versão de software e, caso se aplique, número de etiqueta de serviço (Service Tag) do Computador



Obrigado.

GeneXpert.

Xpert

122945789012145
113440078



Cepheid.

www.Cepheid.com

 Cepheid.