

# Formazione sul saggio: Xpert<sup>®</sup> Breast Cancer STRAT4

*Formazione tecnica solo per  
prodotti CE-IVD*



# Programma di formazione

- Programma di formazione Xpert Breast Cancer STRAT4
  - Applicazione clinica
  - Reagenti
  - Conservazione e manipolazione dei kit
  - Precauzioni
  - Preparazione del campione
  - Preparazione della cartuccia
  - Controllo qualità
  - Analisi dei risultati





# Obiettivi del programma di formazione

Al termine della formazione, l'operatore sarà in grado di:

- Conservare e gestire il kit di cartucce Xpert Breast Cancer STRAT4
- Conservare e manipolare Xpert FFPE Lysis Kit
- Seguire le adeguate precauzioni di sicurezza del laboratorio
- Elaborare e trasportare i campioni
- Predisporre la cartuccia ed eseguire il saggio
- Refertare i vari risultati generati dal software
- Comprendere la strategia di controllo del saggio

# Tumore al seno



# Fatti sul tumore al seno

- Il tumore al seno è uno dei tumori più comuni tra le donne in tutto il mondo.
- È la causa più comune di mortalità per tumore tra le donne nei paesi in via di sviluppo.
- È la seconda causa più comune di mortalità da tumore (dopo il tumore ai polmoni) tra le donne nei paesi sviluppati.
- La mortalità per tumore al seno è diminuita del 34% dal 1990, grazie principalmente al miglioramento dei trattamenti e alla diagnosi precoce.

## Riferimenti bibliografici

American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.

International Agency for Research on Cancer (IARC, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro) e World Health Organization (WHO, Organizzazione Mondiale della Sanità). 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.

# Che cos'è il tumore al seno?

- Il tumore al seno origina principalmente nei dotti e nei lobuli del seno
- Il tumore al seno può essere classificato in quattro sottotipi molecolari intrinseci che forniscono informazioni prognostiche e predittive
  - Luminal A, Luminal B, HER2-arricchito e Triplo Negativo (Basale)
- Selezione del primo regime terapeutico determinato dall'espressione di quattro biomarcatori
  - Il recettore dell'estrogeno (ER [proteina] o ESR1 [mRNA]), il recettore del progesterone (PR [protein] o PGR [mRNA]), il recettore del fattore di crescita epidermico umano (HER2 [proteina] o ERBB2 [mRNA]), il marcatore di proliferazione Ki-67 (Ki67 [proteina] o MKi67 [mRNA])
  - Prassi standard per la caratterizzazione iniziale di ogni paziente con tumore al seno
  - I biomarcatori sono sia prognostici sia predittivi
- I metodi attuali per la misura di biomarcatori includono:
  - Immunoistochimica (IHC) per valutare l'espressione di proteine
  - Ibridazione fluorescente in situ (FISH) per cercare l'amplificazione del gene (solo HER2)

## Riferimenti bibliografici

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.

# L'esigenza

- Tempi di completamento dei risultati più veloci
  - Gli attuali tempi di completamento richiedono giorni. La riduzione del tempo di attesa per l'inizio del trattamento per le donne con recente diagnosi di tumore al seno è un vantaggio per il GX.
- Procedura più standardizzata, meno soggettiva e molto più facile da eseguire
  - L'immunoistochimica (IHC) e la colorazione mediante ibridazione con fluorescenza *in situ* (FISH) possono essere soggettive e difficili da standardizzare tra i laboratori. Secondo l'IHC, non tutti gli anticorpi sono creati uguali.
- Alternativa più economica
  - Le apparecchiature e i reagenti di colorazione possono essere costosi
- Miglioramento del percorso di gestione delle pazienti
  - Consentire che i test di laboratorio vengano eseguiti più vicino alla paziente per ottenere risultati più veloci
  - Consentire ai patologi di controllare gli aspetti del test, limitando la necessità di test di laboratorio di riferimento
  - Probabilmente rappresenta l'unica soluzione efficace per le pazienti nei paesi in via di sviluppo dove l'IHC è molto difficile e costosa da eseguire. La metodica FISH non è di fatto disponibile alle pazienti dei paesi in via di sviluppo.

# La soluzione

- **Attribuisce il potere al patologo**
  - Ottimizzazione del personale di laboratorio - Altamente riproducibile, di semplice utilizzo e facile formazione
  - Il saggio può essere eseguito nel laboratorio istologico o clinico
- **Ridotta soggettività rispetto all'IHC**
  - Ottima concordanza con gli standard riconosciuti - 90% concordanza globale in tutti e 4 i marcatori.
  - Risultati continui e senza ambiguità
  - Risultati facili da interpretare
- **Potenziati miglioramenti del flusso di lavoro**
  - Risultati fruibili - Tempi di completamento dei risultati veloci di ~2 ore
  - Permette un vero accesso random
- **Procedura di lisi semplificata per FFPE**
  - Kit in confezione comoda e facile da usare
- **Controlli esterni disponibili in commercio\***

# La soluzione Cepheid



- Quattro target mRNA misurati (ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67).
- Il gene di riferimento della proteina citoplasmatica 1 interagente con FMR1 (CYFIP1) funziona come controllo dell'adeguatezza dei campioni e viene utilizzato per normalizzare i livelli di espressione di mRNA.
- Semplice e facile da utilizzare
- Sistema a cartuccia chiusa per ridurre al minimo il rischio di contaminazione
- Tre controlli interni per ogni singolo campione
  - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
  - Controllo interno Cepheid (CIC)
  - Controllo dell'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC)

# Xpert<sup>®</sup> Breast Cancer STRAT4



# Uso previsto\*

Xpert Breast Cancer STRAT4 è un saggio semiquantitativo basato sulla reazione a catena della polimerasi, con valori di cutoff qualitativi per l'mRNA del recettore degli estrogeni (ESR1), del recettore del progesterone (PGR), del recettore del fattore di crescita umano dell'epidermide 2 (ERBB2) e del marcatore di proliferazione Ki-67 (MKi67), isolato da tessuto di carcinoma mammario invasivo fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). L'RNA è estratto da un'area di una sezione tissutale per microscopia arricchita di cellule tumorali e identificata da un patologo. Il test va usato in abbinamento ad altri dati clinici e di laboratorio per classificare i tessuti del carcinoma mammario per quanto riguarda lo stato dei recettori ormonali, lo stato del recettore HER2 e lo stato dei marcatori di proliferazione. Il test è destinato all'uso con il sistema GeneXpert®, che include l'isolamento dell'RNA dal tessuto FFPE, nonché l'amplificazione e il rilevamento delle sequenze bersaglio all'interno della cartuccia.

Il saggio Xpert Breast Cancer STRAT4 non è previsto come:

- predittore della gravità della malattia;
- dispositivo autonomo per analisi diagnostiche del tumore al seno;
- prognosticatore della recidiva della malattia.

Indicazioni per l'uso – Il saggio è previsto per l'uso nella determinazione dei livelli di mRNA di ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 nei tessuti con carcinoma mammario invasivo ottenuti da pazienti e preparati come campioni FFPE, e come ausilio nella valutazione clinica assieme ad altri dati di laboratorio.

\*CE-IVD. Dispositivo medico in vitro.

# Requisiti dei sistemi e dei reagenti

## Sistemi GeneXpert

- Strumento GeneXpert a sei colori
- Software GeneXpert versione 4.7b o superiore
- software Xpertise versione 6.4b o successiva

## Kit di test (CE-IVD)

- GXBCSTRAT4-CE-10

## Materiali necessari ma non forniti

- Xpert® FFPE Lysis Kit, n. catalogo #GXFFPE-LYSIS-CE-10
- Etanolo  $\geq 95\%$
- Miscelatore vortex
- Pipette e puntali con filtro resistente agli aerosol per pipette da 5, 20, 260, 520 e 1200  $\mu\text{l}$
- Termoblocco a 80 °C per provette da microcentrifuga da 1,5 ml
- Microcentrifuga per provette da microcentrifuga da 1,5 ml

# Componenti del kit Xpert Breast Cancer STRAT4

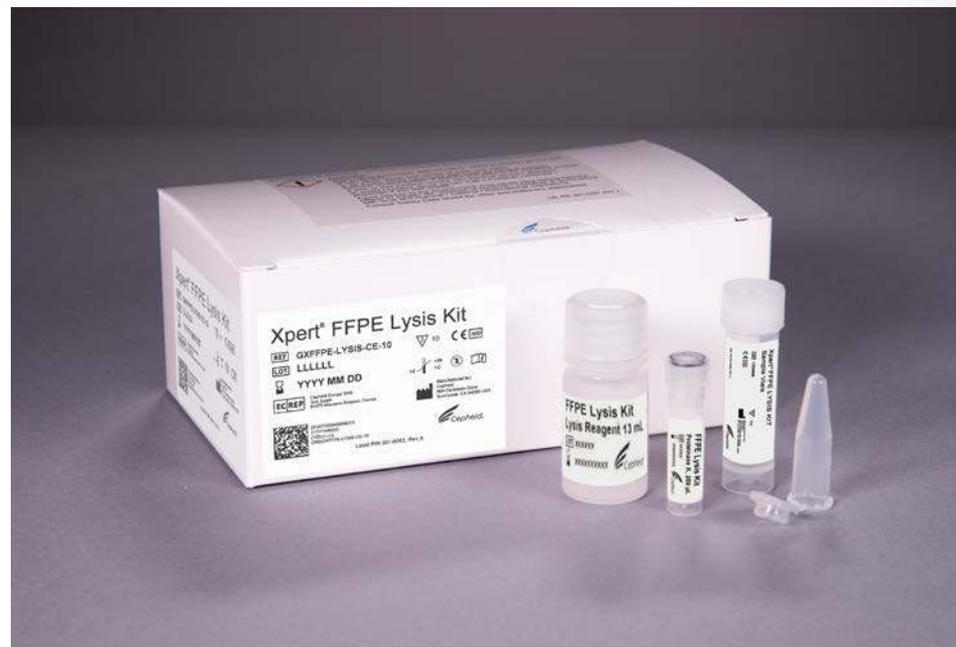
	Xpert Breast Cancer STRAT4
Numero di catalogo	GXBCSTRAT4-CE-10
Test eseguibili con ciascun kit	10
Contenuto della cartuccia per il test	Microsfere di reagente
	Reattivi di eluizione e risciacquo
CD del kit	File di definizione del saggio (Assay definition file, ADF)- .gxa
	Istruzioni per l'importazione del saggio
	Foglietto illustrativo (PDF)
	File di report del software ONCore - .onc
Stoccaggio	da 2 °C a 28 °C



*Le cartucce contengono sostanze chimiche pericolose. Per ulteriori informazioni, vedere il Foglietto illustrativo e la Scheda dati di sicurezza.*

# Componenti di Xpert FFPE Lysis Kit

	Xpert FFPE Lysis Kit
Numero di catalogo	GXFFPE-LYSIS-CE-10
Test eseguibili con ciascun kit	10
Provette di lisi (1,5 ml)	10
Flaconcini per campioni (5 ml)	10
Reagente di lisi FFPE	13 ml
Proteinasi K (PK)	250 µl
Stoccaggio	da 2 °C a 28 °C



*I kit contengono sostanze chimiche pericolose. Per ulteriori informazioni, vedere il Foglietto illustrativo e la Scheda dati di sicurezza.*

# Buona prassi di laboratorio

## Predisposizione del laboratorio per la PCR

- Preparazione di cartucce e reagenti → Aggiunta del campione → Rilevamento

## Conservazione di campioni di analisi e reagenti

- Conservare i campioni di analisi separatamente rispetto ai reagenti per prevenire la contaminazione di questi ultimi.

## Apparecchiatura

- Usare puntali per pipette con filtro, quando necessario.
- Seguire i consigli del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature di laboratorio.



# Buona prassi di laboratorio (continuaz.)

## Pulizia

- Pulire le superfici di lavoro con candeggina per uso domestico\* diluita 1:10 in acqua, seguita da una soluzione di etanolo al 70%. Asciugare le superfici di lavoro con un panno.

## Personale

- Indossare camice da laboratorio e guanti puliti.
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento.

## Area del banco di laboratorio

- Pulire regolarmente l'area del banco di laboratorio.
- Tenere priva di polvere l'area sul retro degli strumenti.

*\* La concentrazione finale di cloro attivo deve essere dello 0,5%, indipendentemente dalla concentrazione della candeggina per uso domestico presente nel Paese di utilizzo.*



# Stoccaggio e manipolazione di Xpert Breast Cancer STRAT4 e FFPE Lysis Kit

- Conservare i kit di test a temperature comprese fra 2 °C e 28 °C.
- Non utilizzare cartucce scadute.
- Ciascuna cartuccia monouso serve per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Non aprire la cartuccia fino a quando non si è pronti per utilizzarla.
  - Iniziare il test entro 30 minuti dall'introduzione del campione nella cartuccia.
  - La stabilità a bordo del sistema Infinity è di 6 ore.
- Evitare la contaminazione crociata durante i passaggi di manipolazione dei campioni.
  - Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro.
- Non utilizzare le cartucce dopo averle fatte cadere o agitate.
  - Se la cartuccia viene agitata o cade dopo l'apertura del coperchio, si possono ottenere risultati non validi.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.
- Non sostituire con altri reagenti.
- Non usare cartucce il cui contenuto appaia torbido o con colorazione anomala.



# Avvertenze e precauzioni

- Maneggiare tutti i reagenti per campioni e i reagenti del kit impiegando tecniche appropriate per prevenire o ridurre al minimo la contaminazione da RNasi e/o DNasi.
- Non riutilizzare le lame per macrodissezione, i puntali o le provette/i flaconcini per evitare la contaminazione crociata durante la manipolazione dei campioni.
- L'asportazione incompleta (raschiamento) dell'area tumorale dal vetrino per la preparazione del lisato FFPE può rendere insufficiente il materiale per il saggio, determinando quindi un tasso di indeterminati/NON VALIDI (INVALID) superiore al previsto.
- Trattare tutti i campioni biologici, incluse le cartucce usate, in base alle precauzioni standard.
- Il tessuto FFPE deve essere trattato con Xpert FFPE Lysis Kit.
- Per manipolare campioni di analisi e reagenti, indossare guanti protettivi monouso, camici da laboratorio e protezione per gli occhi.
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.

# Preparazione dei campioni



# Requisiti per il tessuto FFPE

- Possono essere utilizzate sezioni di tessuti o nastri di tessuti FFPE non sottoposti a colorazione.
- Per preparare il tessuto FFPE, seguire le linee guida ASCO/CAP.
- I campioni di analisi devono essere stati fissati in soltanto il 10% di formalina neutra tamponata (NBF) per un periodo compreso fra 6 e 72 ore.
- Il lisato FFPE deve essere preparato dal blocchetto di tumore FFPE con la più ampia area di carcinoma mammario utilizzabile (minimo 30% di cellularità tumorale).
- Se è necessaria la macrodissezione, utilizzare come guida un vetrino adiacente colorato con H&E appartenente al blocchetto di tumore FFPE per contrassegnare il vetrino non colorato.
- Per i campioni di tumore inferiori a 10 mm<sup>2</sup> con meno del 30% di cellule tumorali, al fine di ottenere risultati validi può essere necessario seguire la procedura per ottenere un lisato concentrato o usare più di una sezione da 4-5 µm.
- La qualità di alcuni tessuti FFPE che risalgono a oltre 10 anni potrebbe non essere sufficiente per l'analisi GeneXpert (l'RNA si degrada nel tempo, anche nei tessuti FFPE).

# Preparazione dei vetrini/nastri - Continuaz.

1. Tagliare due sezioni di tessuto e posizionarle ciascuna su un vetrino distinto.
2. Colorare un vetrino con H&E.
3. Il patologo esamina il vetrino H&E per demarcare il tumore e le aree non tumorali.
4. Se è presente un'appropriata zona tumorale (> 30% e nessun carcinoma duttale in situ, DCIS), può essere utilizzata l'intera sezione del secondo vetrino. In alternativa, si può eseguire la macrodissezione per rimuovere aree specifiche per il test.



Tessuto FFPE



Immagine di  
Thomas Sherwood



Immagine di Cepheid

# Istruzioni di raschiatura

Etichettare una provetta di lisi da 1,5 ml (fornita) per ciascun campione da analizzare.

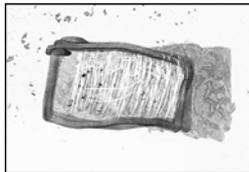
- Se la macrodissezione non è necessaria:
  - Con una lama da rasoio nuova o un bisturi per ciascun campione di tessuto da analizzare, rimuovere completamente (grattando) dal vetrino la sezione di tessuto di tumore invasivo e trasferirla nella provetta di lisi da 1,5 ml etichettata.
- Se la macrodissezione è necessaria:
  - Esaminare il vetrino colorato con H&E (patologo).
  - Identificare (e delineare) l'area tumorale da selezionare per il test. Fare riferimento al foglietto illustrativo del saggio Xpert per il numero richiesto di vetrini o i requisiti minimi di cellularità del tumore.
  - Tratteggiare l'area del tumore da utilizzare per il saggio sul retro dei vetrini non colorati allineandola con il vetrino corrispondente colorato con H&E e trasponendo l'area così delineata.
  - Eseguire la macrodissezione (patologo o tecnico).
  - Con una lama da rasoio nuova o un bisturi per ciascun campione di tessuto da analizzare, rimuovere completamente (grattando) dal vetrino il tessuto di tumore invasivo tratteggiato (vedere Figura 1) e trasferirlo nella provetta di lisi da 1,5 ml etichettata.

**Figura 1. Esempi di rimozione adeguata (consigliata) e inadeguata (sconsigliata) di tessuto dal vetrino**

**Fare riferimento al vetrino colorato con H&E**



**Sconsigliato (tessuto rimosso insufficiente)**



**Consigliato**



Immagini di Cepheid

# Scheda di preparazione del lisato FFPE Xpert

## Preparazione di lisato FFPE\* Xpert® \*FFPE - fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE)

Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni, fare riferimento al foglietto illustrativo.

Per una copia della SDS, consultare il sito: [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o [www.cepheidinternational.com](mailto:www.cepheidinternational.com)

Assistenza Tecnica di Cepheid  
Ufficio USA  
+1 (866) 638-3222, opzione 2  
[techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

Ufficio europeo  
+33 563 82 53 19  
[support@cepheidurope.com](mailto:support@cepheidurope.com)



- 1 Raschiare la sezione di tessuto o macrodissezione dal vetrino.



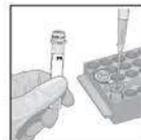
- 2 Trasferire il tessuto alla provetta da 1,5 ml fornita.



- 3 Aggiungere 1,2 ml di reagente di lisi FFPE nella provetta da 1,5 ml contenente il tessuto FFPE.



- 4 Aggiungere 20 µl di Proteinasi K (PK) alla stessa provetta da 1,5 ml. Chiudere il coperchio.



- 5 Vortexare all'impostazione massima per 5 secondi.



- 6 Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.



- 7 Incubare il campione a 80 °C per 30 minuti.



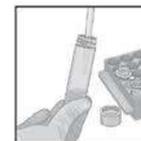
- 8 Vortexare all'impostazione massima per 5 secondi.



- 9 Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.



- 10 Trasferire l'intero contenuto nel flaconcino da 5 ml fornito.



- 11 Aggiungere 1,2 ml di etanolo ≥ 95% allo stesso flaconcino per campioni da 5 ml.



- 12 Tappare bene il flaconcino e vortexare il campione all'impostazione massima per 15 secondi.



**NOTA:** Il lisato preparato, con etanolo, è stabile da 2 °C a 8 °C, fino a 1 settimana. E a ≤ -20 °C per massimo 4 settimane.

# Trattamento del tessuto FFPE

1. Preriscaldare il termoblocco a 80 °C.
2. Aggiungere 1,2 ml di reagente di lisi FFPE nella provetta da 1,5 ml contenente la sezione/il nastro FFPE.
3. Aggiungere 20 µl di Proteinasi K (PK) alla stessa provetta di lisi da 1,5 ml.
4. Chiudere il coperchio.
5. Vortexare ininterrottamente il campione all'impostazione massima per 5 secondi.
6. Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.
7. Con un termoblocco impostato a 80 °C, incubare per 30 minuti la provetta di lisi da 1,5 ml contenente il campione e il reagente di lisi.
8. Vortexare ininterrottamente il campione all'impostazione massima per 5 secondi.
9. Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.
10. Utilizzando una pipetta, trasferire l'intero contenuto (~1,2 ml) in un flaconcino per campioni da 5 ml (fornito).
11. Etichettare il flaconcino per ciascun campione da analizzare.
12. Aggiungere 1,2 ml di etanolo ≥ 95% allo stesso flaconcino per campioni da 5 ml.
13. Tappare bene il flaconcino e vortexare ininterrottamente il campione all'impostazione massima per 15 secondi.

# Trasporto e conservazione dei campioni di analisi Xpert Breast Cancer STRAT4

Campione di analisi	Temperatura di trasporto e conservazione (°C)	Durata della conservazione
Nastro, in provetta da 1,5 ml	2-8 °C	2 settimane
Sezione del vetrino	2-8 °C	1 mese
Sezioni sottoposte a macrodissezione, in provetta da 1,5 ml	2-8 °C	2 settimane
Lisato preparato con etanolo	2-8 °C	1 settimana
	≤ -20 °C	1 mese
	-80 °C	A lungo termine

# Scheda di preparazione della cartuccia Xpert Breast Cancer STRAT4

## Preparazione della cartuccia Xpert® Breast Cancer STRAT4

Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni, fare riferimento al foglietto illustrativo.

Per una copia della SDS, consultare il sito: [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o [www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

Assistenza Tecnica di Cepheid  
Ufficio USA  
+1 (888) 838-3222, opzione 2  
[techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

Ufficio europeo  
+33 553 62 53 19  
[support@cepheideurope.com](mailto:support@cepheideurope.com)



**NOTA:** Se la preparazione del lisato FFPE, come descritto sul retro di questa scheda, è stata appena completata, è possibile ignorare la fase 2 delle istruzioni riportate di seguito.

- 1 Procurarsi una cartuccia e un lisato FFPE preparato per ciascun campione da testare.



- 2 Vortexare il lisato FFPE per 15 secondi.



- 3 Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.



- 4 Pipettare 520 µl di lisato preparato dal flaconcino da 5 ml e trasferirlo nella camera del campione.



- 5 Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.



- 6 Avviare il saggio entro l'arco di tempo specificato nel foglietto illustrativo.

# Procedura di analisi – Preparazione della cartuccia

## Se si utilizza uno strumento GeneXpert Dx

- Iniziare il test entro 30 minuti dall'introduzione del campione preparato nella cartuccia.

## Se si utilizza uno strumento GeneXpert Infinity

- Ordinare il test e mettere la cartuccia sul trasportatore entro 30 minuti dall'aggiunta nella cartuccia del campione preparato.
- Il software Xpertise® tiene traccia della stabilità a bordo residua, in modo che i test vengano eseguiti prima della scadenza a bordo di 6 ore.



# Fasi automatizzate del saggio Xpert Breast Cancer STRAT4





# Smaltimento dei rifiuti

- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard.
- Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali della propria struttura sanitaria per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali.
- Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.

# Controllo qualità

*Per maggiori dettagli, consultare  
il foglietto illustrativo*



# Controllo del sistema di strumentazione – Verifica stato

- Il controllo del sistema di strumentazione verifica i sistemi ottici, la temperatura del modulo e l'integrità meccanica di ciascuna cartuccia.
  - Se i controlli del sistema non vengono superati, il sistema segnalerà un risultato ERRORE (ERROR).



# Strategia di controllo del saggio Cepheid

- Ciascuna cartuccia Xpert è un dispositivo di test autonomo.
  - Cepheid ha formulato controlli interni che consentono al sistema di rilevare specifiche modalità di errore in ciascuna cartuccia.
    - Controllo del reagente: controllo per la verifica della sonda (PCC)
    - Controllo dell'adeguatezza dei campioni: gene di riferimento (CYFIP1)
    - Controllo interno Cepheid: Armored RNA (CIC)



# Controllo per la verifica della sonda – (PCC)

- Dopo la preparazione del campione, la ricostituzione delle microsfere e il riempimento della provetta (prima dell'esecuzione dei cicli termici), vengono effettuate svariate misurazioni della fluorescenza a temperature differenti.
- I valori rilevati vengono confrontati con le impostazioni predefinite stabilite da Cepheid.
- La verifica della sonda serve a individuare:
  - assenza di microsfere di reagente specifico per la sequenza bersaglio (Target Specific Reagent, TSR) e/o di reagente enzimatico, che contengono tutti i primer, le sonde e i template del controllo interno
  - ricostituzione incompleta dei reagenti
  - riempimento incompleto della provetta di reazione
  - degradazione della sonda
- Se la verifica della sonda non viene superata, il sistema segnalerà un risultato **ERRORE (ERROR)**.

# Controllo dell'adeguatezza dei campioni – SAC

- Il controllo dell'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC) verifica che alla camera del campione siano state aggiunte cellule umane e RNA umano. Il controllo SAC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- Controllo CYFIP1: Proteina citoplasmatica 1 interagente con FMR1
  - Questo gene di riferimento viene usato per normalizzare i livelli di espressione di ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67.
  - Serve anche come controllo dell'adeguatezza dei campioni (SAC) per garantire che il campione contenga RNA sufficiente.
- Per un risultato del test valido è necessario un segnale CYFIP1 minimo.
- Un SAC negativo può essere dovuto alle cause seguenti:
  - RNA insufficiente
  - Raccolta di campioni inappropriata
  - Lisi del campione inefficiente
  - Miscelazione insufficiente del campione
- Se il SAC non dà i risultati previsti in un campione analita-negativo, il sistema segnalerà un risultato NON VALIDO (INVALID).

# Controllo interno Cepheid – CIC

- Il controllo interno Cepheid (CIC) assicura che il campione sia stato processato correttamente.
- Il CIC è Armored RNA®.
- Verifica che la reazione RT-PCR sia avvenuta con inibizione minima.



# Controlli esterni STRAT4\*

Fornitore	Nome del controllo	Descrizione	Configurazione	Temperatura conservazione
Horizon DX** <a href="http://www.horizondiscovery.com">www.horizondiscovery.com</a>	<b>STRAT4 FFPE Control A</b>	ESR1 POS PGR POS ERBB2 NEG MKi67 POS	Vetrini sezionati	4 °C
	<b>STRAT4 FFPE Control B</b>	ESR1 POS/NEG PGR POS ERBB2 POS MKi67 POS/NEG	Vetrini sezionati	4 °C
	<b>STRAT4 FFPE Control C</b>	ESR1 NEG PGR NEG ERBB2 NEG MKi67 POS/NEG	Vetrini sezionati	4 °C

\* I controlli esterni sono ancora in fase di sviluppo.

\*\* **Fornitore alternativo: AICC**

**Nota: per i campioni negativi, la mancanza di cellule umane causa un risultato NON VALIDO (INVALID)**

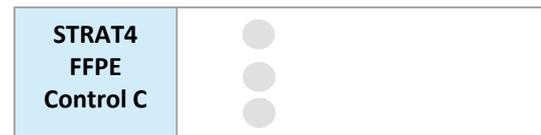
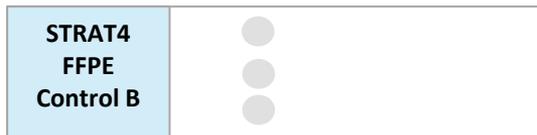
I controlli esterni devono essere usati in conformità ai requisiti degli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti

# Configurazione dei controlli esterni FFPE STRAT 4

	Controllo Xpert Breast Cancer STRAT4 FFPE		
Targets	STRAT4 FFPE Control A	STRAT4 FFPE Control B	STRAT4 FFPE Control C
<b>ESR1</b>	pos	pos (vicino al cutoff)	neg
<b>PGR</b>	pos	pos	neg
<b>ERBB2</b>	neg	pos	neg
<b>MKi67</b>	pos	pos (vicino al cutoff)	pos



Immagine di Cepheid



**Confezione:  
Controlli FFPE, Istruzioni, Certificato di Analisi**

# Analisi dei risultati

*Per maggiori dettagli, consultare  
il foglietto illustrativo*



# Risultati

- Xpert Breast Cancer STRAT4 fornisce risultati di test POSITIVI o NEGATIVI per ciascun bersaglio.
- Il rapporto finale contiene il risultato individuale di ciascun bersaglio.
- Un bersaglio è considerato positivo quando ha iperespressione di mRNA in relazione al gene di riferimento.
- Affinché ESR1 e ERBB2 abbiano un risultato valido, il controllo CYFIP1 deve essere RIUSCITO (PASS).
- Affinché PGR e MKi67 abbiano un risultato valido, il controllo CYFIP1 deve essere RIUSCITO (PASS) e il CYFIP1 alternativo deve essere POS.
- Se il CYFIP1 alternativo è NEG, PGR e MKi67 saranno indeterminati.

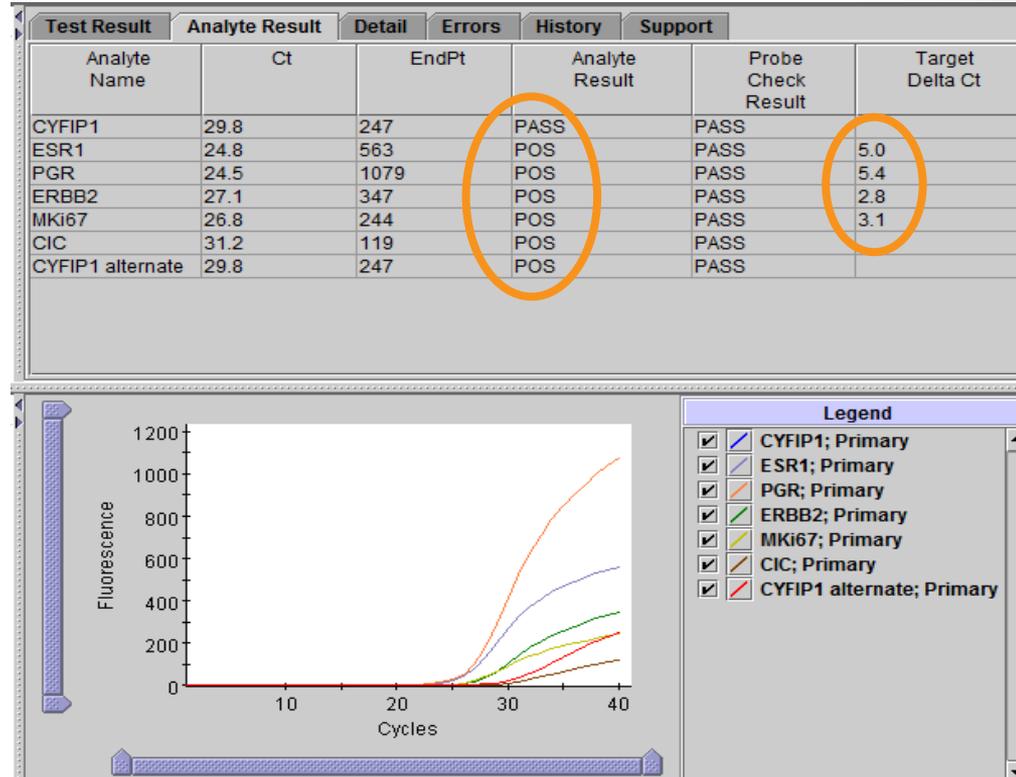
# Riepilogo dei risultati

Risultato visualizzato	CYFIP1	CYFIP1 alternativo	CIC
ESR1 POSITIVO (ESR1 POSITIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
ESR1 NEGATIVO (ESR1 NEGATIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
PGR POSITIVO (PGR POSITIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
PGR NEGATIVO (PGR NEGATIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS	POS/NEG
ERBB2 POSITIVO (ERBB2 POSITIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
ERBB2 NEGATIVO (ERBB2 NEGATIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
MKi67 POSITIVO (MKi67 POSITIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
MKi67 NEGATIVO (MKi67 NEGATIVE)	RIUSCITO (PASS)	POS	POS/NEG
PGR INDETERMINATO (PGR INDETERMINATE)	RIUSCITO (PASS)	NEG	POS/NEG
MKi67 INDETERMINATO (MKi67 INDETERMINATE)	RIUSCITO (PASS)	NEG	POS/NEG
RIPETI TEST (REPEAT TEST)	RIUSCITO (PASS)	POS/NEG	NEG
NON VALIDO (INVALID)	NON RIUSCITO (FAIL)	NEG	POS/NEG
ERRORE (ERROR)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

# POSITIVO (POSITIVE)

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

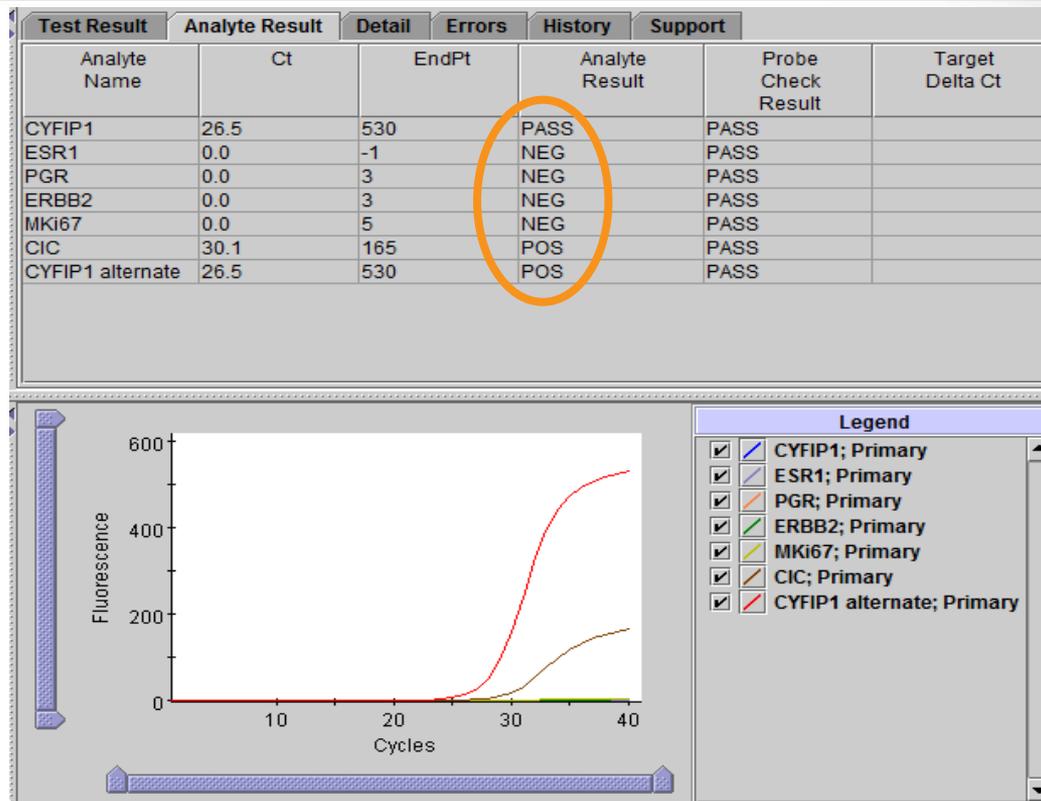
- Il trascritto dell'mRNA bersaglio è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (Ct) superiore all'impostazione di cutoff
- CYFIP1 RIUSCITO (PASS); il trascritto dell'mRNA è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia
- PCC RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi



# NEGATIVO (NEGATIVE)

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

- Il trascritto dell'mRNA bersaglio non è iperespresso e ha un valore delta del ciclo soglia (Ct) inferiore all'impostazione di cutoff.
- CYFIP1 RIUSCITO (PASS); il trascritto dell'mRNA ha un valore Ct entro il range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata.
- PCC RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi

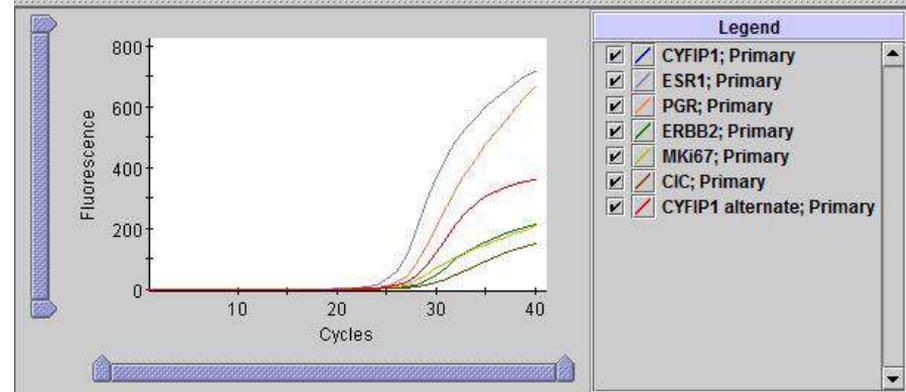


# Risultati misti

- Il bersaglio è positivo o negativo per l'iperpressione dell'mRNA in relazione al gene di riferimento.
- Il trascritto dell'mRNA di CYFIP1 ha un valore di Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra della soglia
- PCC RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi

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	

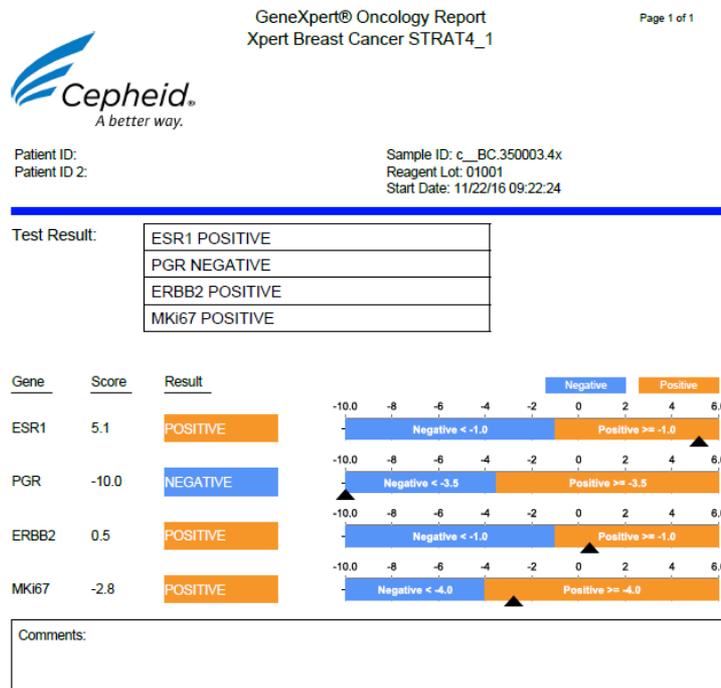


# Software ONCore

- Il software OnCore è installato sul computer Gx



- Consente di trasformare i risultati GxDx o Xpertise in un rapporto.
- Fornisce una rappresentazione grafica dei dati.
- Mostra quanto i risultati di ciascun bersaglio sono vicini ai cutoff.
- Richiede un file .onc univoco che si trova sul disco ADF del saggio





# Motivi per ripetere il saggio con lisato concentrato

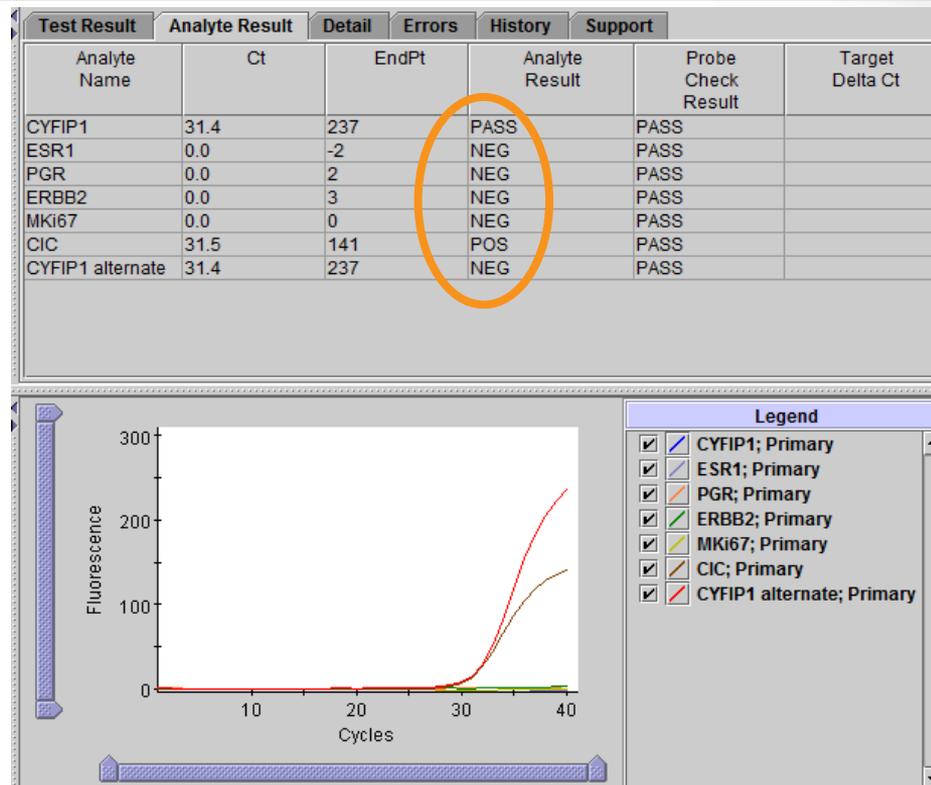
- Un risultato **INDETERMINATO (INDETERMINATE)** indica che il campione contiene materiale insufficiente per l'analisi dei risultati **PGR e/o MKi67**.
- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che il controllo di riferimento non è riuscito.
  - Il campione non è stato trattato correttamente
  - La PCR è stata inibita
  - La qualità dell'RNA del tumore utilizzato era inadeguata
- In ciascuno dei due casi, ripetere il test con un lisato FFPE più concentrato.

# INDETERMINATO (INDETERMINATE)

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

Non è possibile determinare il livello di espressione dell'mRNA di PGR e/o MKi67.

- CYFIP1 alternativo (CYFIP1 alternate) – NEG - il valore Ct non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata.
- PCC RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi

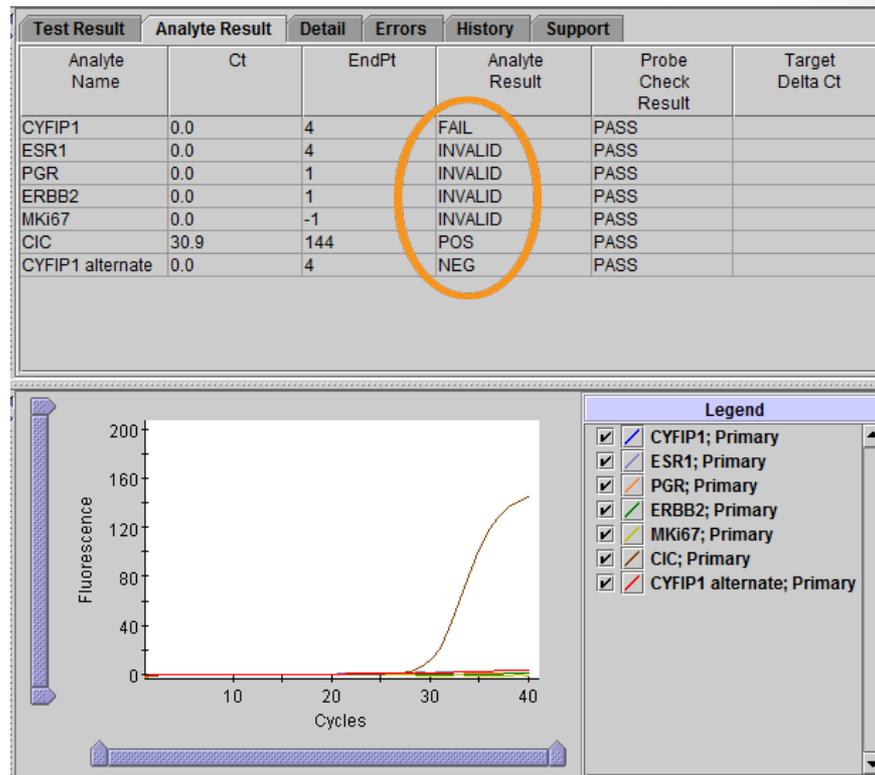


# NON VALIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**

Non è possibile determinare i livelli di espressione degli mRNA bersaglio.

- CYFIP1 - NON RIUSCITO (FAIL)  
– Il valore Ct non rientrava nel range di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata.
- CYFIP1 alternativo (CYFIP1 alternate) - NEG
- PCC RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi



# Procedura di ripetizione del test Xpert Breast Cancer STRAT4 per risultati incerti o non validi

## PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST Xpert® Breast Cancer STRAT4

per risultati indeterminati o non validi – Preparazione del lisato FFPE concentrato

Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni, fare riferimento al foglietto illustrativo.

Per una copia della SDS, consultare il sito [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o [www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

Assistenza Tecnica di Cepheid  
Ufficio USA  
+1 (888) 638-3222, opzione 2  
[techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

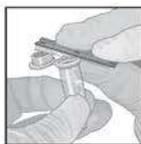
Ufficio europeo  
+33 563 82 53 19  
[support@cepheideurope.com](mailto:support@cepheideurope.com)



- 1 Raschiare la sezione di tessuto o macrodissezione dal vetrino.



- 2 Trasferire il tessuto alla provetta da 1,5 ml fornita.



- 3 Aggiungere 260 µl di reagente di lisi FFPE nella provetta da 1,5 ml contenente il tessuto FFPE.



- 4 Aggiungere 5 µl di Proteinasi K (PK) alla stessa provetta da 1,5 ml. Chiudere il coperchio.



- 5 Vortexare all'impostazione massima per 5 secondi.



- 6 Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.



- 7 Incubare il campione a 80 °C per 30 minuti.



- 8 Vortexare all'impostazione massima per 5 secondi.



- 9 Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.



- 10 Aggiungere 260 µl di etanolo ≥ 95% alla stessa provetta di lisi da 1,5 ml.



- 11 Chiudere il coperchio e vortexare il campione all'impostazione massima per 15 secondi.



- 12 Microcentrifugare brevemente la provetta per asportare il liquido dal coperchio.



**NOTA:** Il lisato preparato, con etanolo, è stabile da 2 °C a 8 °C, fino a 1 settimana. E a ≤ -20 °C per massimo 4 settimane.



# Motivi per ripetere il test con il lisato trattenuto

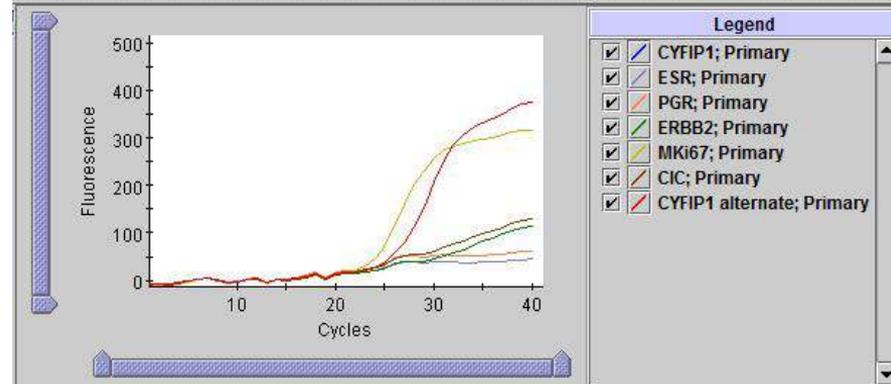
- Un risultato indicante **RIPETI TEST (REPEAT TEST)** significa che il controllo interno (CIC) non è riuscito. Il campione non è stato trattato correttamente.
- Il risultato **ERRORE (ERROR)** indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda del reagente, del superamento dei limiti massimi di pressione o dell'individuazione di un errore di posizionamento della valvola.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi mentre era in corso oppure si è verificata un'interruzione di corrente.
- In questi casi, ripetere il test con una nuova aliquota da 520 µl del lisato FFPE trattenuto.

# RIPETI TEST (REPEAT TEST)

Test Result REPEAT TEST

- Non è possibile determinare i livelli di espressione dei bersagli mRNA.
- CIC NEG; il controllo interno ha un valore Ct al di fuori del range di validità.

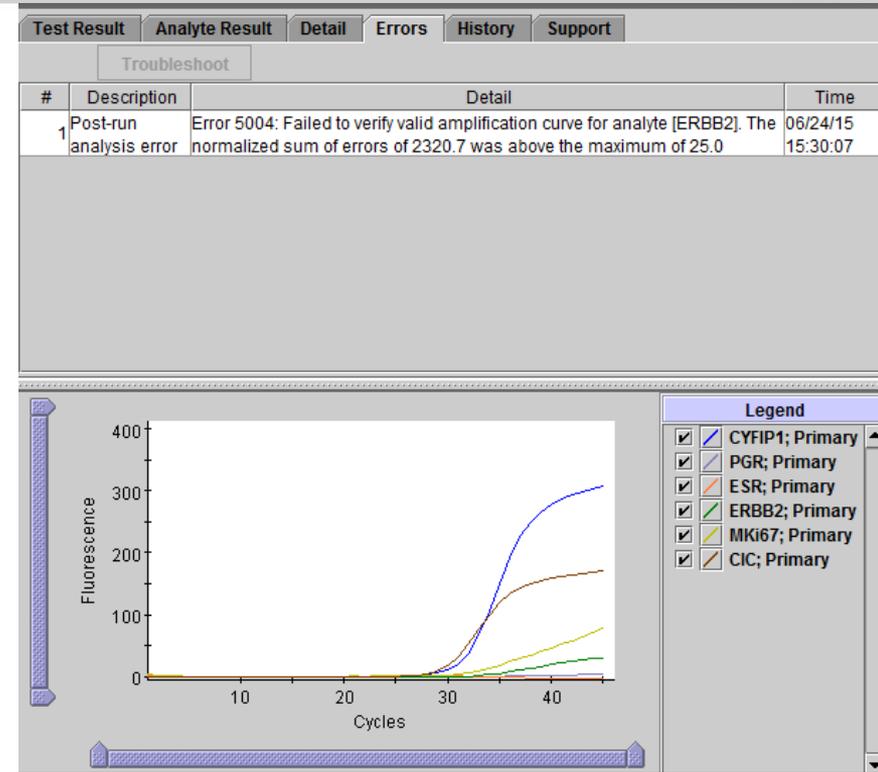
Test Result	Analyte Result	Detail	Errors	History	Messages	Support
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct	
CYFIP1	22.8	375	PASS	PASS		
ESR	23.7	44	POS	PASS	-0.9	
PGR	20.8	60	POS	PASS	2.0	
ERBB2	24.2	113	NEG	PASS	-1.4	
MKI67	21.7	317	POS	PASS	1.1	
CIC	22.3	131	NEG	PASS		
CYFIP1 alternate	22.8	375	POS	PASS		



# ERRORE (ERROR)

Test Result **ERROR**

- Non è possibile determinare i livelli di espressione dei bersagli mRNA.
  - Verifica della sonda NON RIUSCITA (FAIL)\*: uno o tutti i risultati della verifica della sonda non sono validi.
- \* Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore è derivato dal superamento del limite massimo di pressione, da un errore di adattamento della curva oppure dal guasto di un componente del sistema.



# NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

Test Result **NO RESULT**

- Non è possibile determinare i livelli di espressione degli mRNA bersaglio.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti.
  - Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test mentre era in corso.
- PCC NA (non applicabile).

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>

# Procedura di ripetizione del test Xpert Breast Cancer STRAT4 per risultati Nessun risultato (No Result), Ripeti test (Repeat Test) o Errore (Error)

## PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST Xpert® Breast Cancer STRAT4

per Nessun risultato (No Result), Ripeti test (Repeat Test) o Risultati errore (Error Results)

**Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni fare riferimento al foglietto illustrativo.**

Per una copia della SDS, consultare il sito:  
[www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o  
[www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

Assistenza Tecnica di Cepheid  
Ufficio USA  
+1 (888) 838-3222, opzione 2  
[techsupport1@cepheid.com](mailto:techsupport1@cepheid.com)

Ufficio europeo  
+33 563 82 53 19  
[support@cepheideurope.com](mailto:support@cepheideurope.com)



1 Procurarsi una nuova cartuccia e il lisato FFPE messo da parte in precedenza per ciascun campione di cui ripetere il test.



2 Vortare il lisato FFPE per 15 secondi.



3 Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.



4 Pipettare 520 µl di lisato messo da parte in precedenza dal flaconcino da 5 ml e trasferirli nella camera del campione.



5 Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.



6 Avviare il saggio entro l'arco di tempo specificato nel foglietto illustrativo.



# Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- **Trattamento inadeguato del campione di analisi o del lisato FFPE**
  - Per i passaggi di preparazione del lisato, consultare il foglietto illustrativo.
  - Per i saggi contenenti un controllo SAC, un campione di analisi che non contiene cellule umane darà un risultato non valido se l'analita è negativo.
- **Trasporto o conservazione non corretti del campione di analisi o del lisato FFPE prelevato**
  - Le condizioni di conservazione e trasporto sono specifiche per i campioni di analisi.
  - Per le istruzioni sulla corretta manipolazione, fare riferimento al foglietto illustrativo.
- **Procedura di analisi non corretta**
  - Apportando modifiche alle procedure di analisi si possono alterare le prestazioni del test.
  - Un errore tecnico o uno scambio di campioni possono influire sui risultati.
  - Per evitare risultati errati, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni descritte nel foglietto illustrativo.
- **Sostanza interferente**
  - In presenza di sostanze interferenti si possono ottenere risultati falso negativi o risultati non validi.
- **Numero insufficiente di cellule umane o contenuto tumorale nel campione di analisi**

# Limitazioni

- Consultare il foglietto illustrativo per un elenco completo delle limitazioni.



# Assistenza Tecnica

- Cepheid fornisce assistenza tecnica sul campo, telefonicamente, via fax e per e-mail.
- Le informazioni per contattare gli uffici Cepheid sono disponibili all'indirizzo <http://www.cepheid.com/support>
  - Selezionare l'opzione Contattaci (Contact Us) per accedere alle informazioni di contatto
  - Compilare il modulo online per creare una richiesta di assistenza
- Prima di contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:
  - Nome del prodotto
  - Numero di lotto
  - Numero di serie dello strumento
  - Messaggi di errore (se presenti)
  - Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer

Grazie.



[www.Cepheid.com](http://www.Cepheid.com)

