

Formación en el ensayo: Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

*Formación técnica para el producto
CE-IVD solamente*



Programa de formación

- Formación para el Xpert Breast Cancer STRAT4
 - Aplicación clínica
 - Reactivos
 - Conservación y manipulación del kit
 - Precauciones
 - Preparación de la muestra
 - Preparación del cartucho
 - Control de calidad
 - Análisis de resultados





Objetivos del curso

Al final del curso de formación, el usuario será capaz de:

- Conservar y manipular el kit de cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4
- Conservar y manipular el Xpert FFPE Lysis kit
- Tomar las precauciones de seguridad de laboratorio adecuadas
- Procesar y transportar las muestras
- Llevar a cabo la preparación del cartucho y realizar el ensayo
- Notificar los diversos resultados generados por el software
- Comprender la estrategia de control del ensayo

Cáncer de mama



Datos sobre el cáncer de mama:

- El cáncer de mama es uno de los cánceres más comunes entre las mujeres de todo el mundo.
- Es la causa más común de mortalidad por cáncer entre las mujeres de los países en desarrollo.
- Es la segunda causa más común de mortalidad por cáncer (después del cáncer de pulmón) entre las mujeres de los países desarrollados.
- La mortalidad por cáncer de mama ha disminuido un 34 % desde 1990, debido en gran parte a las mejoras del tratamiento y a la detección precoz.

Bibliografía

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.

¿Qué es el cáncer de mama?

- El cáncer de mama se presenta principalmente en los conductos y los lobulillos de la mama
- El cáncer de mama puede clasificarse en cuatro subtipos moleculares intrínsecos que proporcionan información de predicción y pronóstico
 - Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido y Triple negativo (basal)
- Selección del primer régimen terapéutico determinado por la expresión de cuatro biomarcadores
 - Receptor de estrógeno (ER [proteína] o ESR1 [ARNm]), receptor de progesterona (PR [proteína] o PGR [ARNm]), factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 [proteína] o ERBB2 [ARNm]), marcador de proliferación Ki-67 (Ki67 [proteína] o MKi67 [ARNm])
 - Práctica estándar para la caracterización inicial de cada paciente de cáncer de mama
 - Los biomarcadores son predictivos y pronósticos
- Los métodos actuales de medición de los biomarcadores incluyen:
 - Inmunohistoquímica (IHC) para evaluar la expresión de proteínas
 - Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para buscar la amplificación génica (solo HER2)

Bibliografía

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.

La necesidad:

- Resultado más rápido
 - El resultado actual tarda normalmente días. Acortar el tiempo de espera para iniciar el tratamiento para las mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama es una ventaja para el GX.
- Procedimiento más estandarizado y menos subjetiva que es mucho más fácil de realizar
 - La inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) pueden ser subjetivas y difíciles de estandarizar en los laboratorios. Para la IHC, no todos los anticuerpos se crean iguales.
- Alternativa más barata
 - Los equipos de tinción y los reactivos pueden resultar caros
- Mejora en el proceso de tratamiento del paciente
 - Permitir que las pruebas de laboratorio se realicen más cerca del paciente y obtener resultados más rápidos
 - Permitir que los anatomopatólogos controlen los aspectos de las pruebas, a la vez que se limita la necesidad de realizar pruebas de laboratorio de referencia
 - Probablemente representa la única solución viable para pacientes en países en desarrollo, donde la IHC es muy cara y difícil de realizar. FISH no está disponible en absoluto para los pacientes en países en desarrollo.

La solución:

- Facultar al anatomopatólogo
 - Optimización del personal del laboratorio: altamente reproducible, fácil de utilizar y de formar
 - El ensayo puede realizarse en el laboratorio clínico o de histología
- Mejor subjetividad en comparación con la IHC
 - Excelente concordancia con las normas reconocidas: 90 % de concordancia total entre los 4 marcadores.
 - Salida continua sin resultados erróneos
 - Resultados fáciles de interpretar
- Mejoras potenciales en el flujo de trabajo
 - Resultados factibles; resultados rápidos en unas 2 horas
 - Auténtico acceso aleatorio
- Procedimiento de lisis simplificado para FFPE
 - Kit envasado convenientemente y fácil de usar
- Controles externos comerciales disponibles*

La solución Cepheid



- Cuatro dianas de ARNm medidas (ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67).
- El gen de referencia de proteína de interacción con FMR1 citoplasmático 1 (CYFIP1) actúa como control de adecuación de la muestra y se utiliza para normalizar los niveles de expresión de ARNm.
- Sencillo y de fácil manejo
- Sistema de cartucho cerrado que minimiza el riesgo de contaminación
- 3 controles internos para cada muestra
 - Control de comprobación de la sonda (PCC)
 - Control interno de Cepheid (CIC)
 - Control de adecuación de la muestra (SAC)

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4



Uso previsto*

Xpert Breast Cancer STRAT4 es un ensayo semicuantitativo basado en la reacción en cadena de la polimerasa con valores de corte cualitativos para ARNm de receptor de estrógenos (ESR1), receptor de progesterona (PGR), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (ERBB2) y marcador de proliferación Ki-67 (MKi67) aislados de tejido de cáncer de mama invasivo fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). El ARN se extrae de una zona enriquecida de tumor de una sección de tejido microscópica identificada por un anatomopatólogo. La prueba se debe usar en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio para clasificar los tejidos de cáncer de mama en relación con el estado del receptor hormonal, el estado del receptor HER2 y el estado del marcador de proliferación. La prueba está concebida para utilizarse con el sistema GeneXpert® e incluye aislamiento de ARN a partir de tejido FFPE, así como la amplificación y detección de secuencias diana dentro del cartucho.

El ensayo Xpert Breast Cancer STRAT4 no está concebido como:

- Predictor de la gravedad de la enfermedad
- Dispositivo autónomo para pruebas diagnósticas de cáncer de mama
- Un pronosticador de recaídas de la enfermedad

Instrucciones de uso: El ensayo se ha concebido para su uso en la evaluación de niveles de ARNm de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67 en tejidos con cáncer de mama invasivo obtenidos de pacientes y preparados como muestras FFPE, y como ayuda en la evaluación clínica junto con otros datos de laboratorio.

*CE-IVD. Producto sanitario para diagnóstico in vitro.

Requisitos del sistema y de los reactivos

Sistemas GeneXpert

- Instrumento GeneXpert de 6 colores
- Software GeneXpert versión 4.7b o superior
- Software Xpertise versión 6.4b o superior

Kits de la prueba (CE-IVD)

- GXBCSTRAT4-CE-10

Material requerido pero no suministrado

- Xpert® FFPE Lysis Kit, N.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10
- ≥95 % de etanol
- Mezclador vórtex
- Pipetas y puntas de pipeta con filtro de aerosol adecuadas para pipetear 5, 20, 260, 520 y 1200 µl
- Bloque calefactor de 80 °C para albergar tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Microcentrífuga para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml

Componentes del kit Xpert Breast Cancer STRAT4

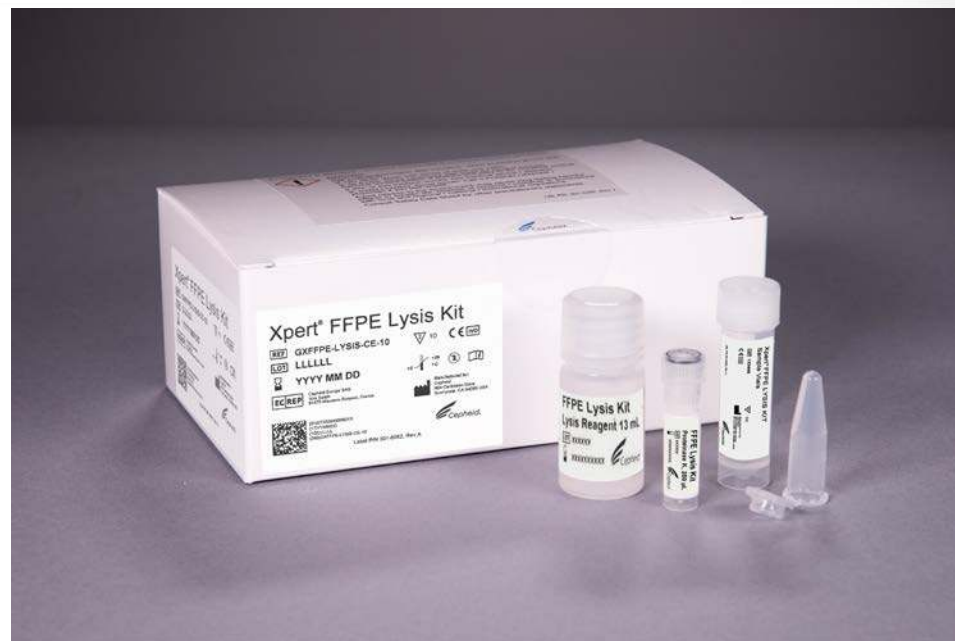
	Xpert Breast Cancer STRAT4
Número de catálogo	GXBCSTRAT4-CE-10
Pruebas por kit	10
Contenido por cartucho de la prueba	Microesferas de reactivo
	Reactivos de elución y aclarado
CD del kit	Archivo de definición del ensayo (ADF, Assay Definition File) -.gxa
	Instrucciones para la importación de ensayos
	Prospecto (PDF)
	Archivo de informe de software ONCore - .onc
Conservación	De 2 °C a 28 °C



Los cartuchos contienen sustancias químicamente peligrosas; consulte el prospecto y la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada.

Componentes del Xpert FFPE Lysis Kit

	Xpert FFPE Lysis Kit
Número de catálogo	GXFFPE-LYSIS-CE-10
Pruebas por kit	10
Tubos de lisis (1,5 ml)	10
Viales para muestras (5 ml)	10
Reactivo de lisis FFPE	13 ml
Proteinasa K (PK)	250 µl
Conservación	De 2 °C a 28 °C



Los kits contienen sustancias químicamente peligrosas; consulte el prospecto y la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada.

Buenas prácticas de laboratorio

Preparación del laboratorio para la PCR

- Preparación del cartucho/reactivo → Adición de muestras → Detección

Conservación de muestras y reactivos

- Conserve las muestras separadas de los reactivos para evitar que estos se contaminen.

Equipo

- Utilice puntas de pipeta con filtro, cuando sea necesario.
- Siga las recomendaciones del fabricante para la calibración y el mantenimiento del equipo de laboratorio.



Buenas prácticas de laboratorio (continuación)

Limpieza

- Limpie las superficies de trabajo con una dilución de lejía doméstica* a una concentración de 1:10 y, a continuación, con una solución de etanol al 70 %. Seque las superficies de trabajo con un paño.

Personal

- Use guantes y bata de laboratorio limpios.
- Cámbiese los guantes cada vez que procese muestras diferentes.

Área de la mesa del laboratorio

- Limpie rutinariamente el área de la mesa del laboratorio.
- Mantenga la parte posterior del instrumento sin polvo.

* La concentración de cloro activo final deberá ser del 0,5 %, independientemente de la concentración de la lejía de uso doméstico en su país.



Conservación y manipulación del Xpert Breast Cancer STRAT4 y el FFPE Lysis Kit

- Conserve los kits de prueba a una temperatura de 2 °C a 28 °C.
- No utilice cartuchos caducados.
- Cada cartucho de un solo uso se utiliza para procesar una sola prueba. No reutilice los cartuchos procesados.
- No abra el cartucho hasta que esté listo para utilizarlo.
 - Inicie la prueba antes de que transcurran 30 minutos desde que se añadió la muestra al cartucho.
 - La estabilidad en el instrumento Infinity es de 6 horas.
- Evite la contaminación cruzada durante los pasos de manipulación de las muestras.
 - Cámbiese los guantes entre una muestra y la siguiente.
- No utilice un cartucho que se haya caído o agitado.
 - Si el cartucho se agita o se deja caer después de haber abierto su tapa, es posible que se obtengan resultados no válidos.
- No utilice cartuchos con tubos de reacción dañados.
- No utilice cartuchos que presenten fugas.
- No sustituya los reactivos por otros reactivos.
- No utilice ningún cartucho cuyo contenido presente turbidez o un cambio de color.



Advertencias y precauciones:

- Manipule todas las muestras y los reactivos del kit utilizando las técnicas adecuadas para evitar o minimizar la contaminación con ARNasa o ADNasa.
- No reutilice las cuchillas de macrodissección, las puntas de pipeta ni los tubos/viales para evitar la contaminación cruzada durante la manipulación de las muestras.
- La extracción incompleta (raspado) del área del tumor del portaobjetos para la preparación del lisado FFPE podría dar lugar a material insuficiente para el ensayo y, por consiguiente, a una tasa de resultados indeterminados/NO VÁLIDO (INVALID) mayor de lo previsto.
- Tome las precauciones habituales al tratar todas las muestras biológicas, incluido los cartuchos usados.
- El tejido FFPE debe procesarse con el Xpert FFPE Lysis Kit.
- Utilice guantes protectores desechables, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras y los reactivos.
- Siga los procedimientos de seguridad del centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.

Preparación de las muestras



Requisitos del tejido FFPE

- Pueden utilizarse secciones de tejido o cortes de tejido FFPE sin teñir.
- Siga las pautas de ASCO/CAP para preparar tejido FFPE.
- Las muestras deben haberse fijado solo en formalina tamponada neutra (NBF) al 10 % durante 6 a 72 horas.
- El lisado FFPE deberá prepararse a partir de un bloque de tumor FFPE con la mayor área de carcinoma de mama adecuado (un mínimo de 30 % de celularidad tumoral).
- Si se requiere macrodissección, utilice un portaobjetos adyacente teñido con H&E del bloque de tumor FFPE como guía para marcar el portaobjetos sin teñir.
- En el caso de las muestras tumorales de menos de 10 mm² con menos de 30 % de tumor, puede ser necesario utilizar el procedimiento de lisado concentrado o más de una sección de 4-5 µm para obtener resultados válidos.
- La calidad de algunos tejidos FFPE con una antigüedad superior a 10 años puede ser insuficiente para el análisis GeneXpert (el ARN se degrada con el tiempo, incluso en tejidos FFPE).

Preparación del portaobjetos/corte curvado (continuación)

1. Cortar dos secciones de tejido y coloque cada una en un portaobjetos de cristal diferente.
2. Tiña un portaobjetos con H&E.
3. El anatomopatólogo examina el portaobjetos con H&E para demarcar las áreas tumorales y no tumorales.
4. Si existe un área tumoral adecuada (>30 % y sin carcinoma ductal in situ), puede utilizarse toda la sección del segundo portaobjetos. Alternativamente, puede realizarse una macrodissección para eliminar áreas específicas para las pruebas.



Tejido FFPE



Imagen de Thomas Sherwood



Imagen de Cepheid

Instrucciones de raspado

Etiquete un tubo de lisis de 1,5 ml (suministrado) para cada muestra que vaya a procesarse.

- Si no es necesaria una macrodissección:
 - Con un bisturí o una cuchilla nuevos para cada muestra de tejido que vaya a procesarse, elimine (rasque) completamente el corte de tejido del tumor invasivo del tejido del portaobjetos y transfiera el corte a un tubo de lisis de 1,5 ml etiquetado.
- Si es necesaria una macrodissección:
 - Examine el portaobjetos teñido con H&E (anatomopatólogo).
 - Identifique (y delimite) el área tumoral que se seleccionará para las pruebas. Consulte en el prospecto del ensayo Xpert el número necesario de portaobjetos o el requisito mínimo de células tumorales.
 - En la parte posterior del portaobjetos sin teñir, delimite el área del tumor que se utilizará en el ensayo, alineándola con el portaobjetos teñido con H&E y transponiendo el área delimitada.
 - Realice la macrodissección (anatomopatólogo o técnico).
 - Con un bisturí o una cuchilla nuevos para cada muestra de tejido que vaya a procesarse, elimine (rasque) completamente el tejido del tumor invasivo delimitado del portaobjetos (vea la Figura 1) y transfiera el tejido a un tubo de lisis de 1,5 ml etiquetado.

Figura 1. Ejemplos de eliminación de tejido correcta (recomendado) e incorrecta (no recomendado) del portaobjetos

Portaobjetos teñido con H&E de referencia



No recomendado (tejido insuficiente eliminado)



Recomendado



Imágenes de Cepheid

Tarjeta de preparación de lisado Xpert FFPE

Preparación del lisado FFPE* Xpert® *FFPE: fijado en formol e incluido en parafina

Consulte el prospecto, donde encontrará instrucciones, precauciones y advertencias detalladas.

Para obtener un ejemplar de la SDS (hoja de datos de seguridad), visite www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com

Servicio técnico de Cepheid
Oficina en EE.UU.
(888) 838-3222, opción 2
techsupport@cepheid.com

Oficina de Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheidurope.com



- 1 Raspe la sección de tejido o la macrodissección del portaobjetos.



- 2 Transfiera el tejido al tubo de 1,5 ml suministrado.



- 3 Añada 1,2 ml de reactivo de lisis FFPE al tubo de 1,5 ml que contiene el tejido FFPE.



- 4 Añada 20 µl de proteinasa K (PK) al mismo tubo de lisis de 1,5 ml. Cierre la tapa.



- 5 Agite en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.



- 6 Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrifuga para desprender el líquido de la tapa.



- 7 Incube la muestra a 80 °C durante 30 minutos.



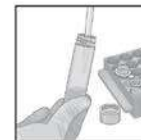
- 8 Agite en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.



- 9 Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrifuga para desprender el líquido de la tapa.



- 10 Transfiera todo el contenido al vial de la muestra de 5 ml.



- 11 Añada 1,2 ml de etanol $\geq 95\%$ al mismo vial de muestra de 5 ml.



- 12 Ajuste la tapa y agite la muestra continuamente en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 15 segundos.



NOTA: El lisado preparado con etanol es estable entre 2 y 8 °C durante un máximo de 1 semana. A ≤ -20 °C, es estable un máximo de 4 semanas.

Procesamiento del tejido FFPE

1. Precaliente el bloque calefactor a 80 °C.
2. Añada 1,2 ml de reactivo de lisis FFPE al tubo de 1,5 ml que contiene el corte plano o curvado FFPE.
3. Añada 20 µl de proteinasa K (PK) al mismo tubo de lisis de 1,5 ml.
4. Cierre la tapa.
5. Agite la muestra continuamente en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.
6. Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrífuga para desprender el líquido de la tapa.
7. Incube el tubo de lisis de 1,5 ml que contiene la muestra y el reactivo de lisis durante 30 minutos en el bloque calefactor ajustado a 80 °C.
8. Agite la muestra continuamente en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.
9. Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrífuga para desprender el líquido de la tapa.
10. Con una pipeta, transfiera todo el contenido (~1,2 ml) a un tubo de 5 ml (suministrado).
11. Etiquete el vial de cada muestra que vaya a procesar.
12. Añada 1,2 ml de etanol $\geq 95\%$ al mismo vial de muestra de 5 ml.
13. Ajuste la tapa y agite la muestra continuamente en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 15 segundos.

Conservación y transporte de la muestra de Xpert Breast Cancer STRAT4

Muestra	Temperatura de transporte y conservación (°C)	Tiempo de conservación
Corte curvado, en tubo de 1,5 ml	2-8 °C	2 semanas
Sección del portaobjetos	2-8 °C	1 mes
Sección o secciones macrodisecionada(s) en tubo de 1,5 ml	2-8 °C	2 semanas
Listado preparado con etanol	2-8 °C	1 semana
	≤ -20 °C	1 mes
	-80 °C	A largo plazo

Tarjeta de preparación del cartucho del Xpert Breast Cancer STRAT4

Preparación del cartucho de Xpert® Breast Cancer STRAT4

Consulte el prospecto, donde encontrará instrucciones, precauciones y advertencias detalladas.

Para obtener un ejemplar de la SDS (hoja de datos de seguridad), visite www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com

Servicio técnico de Cepheid:
Oficina en EE.UU.
(888) 838-3222, opción 2
techsupport@cepheid.com
Oficina de Europa
+33 553 82 53 19
support@cepheid-europe.com



NOTA: Si la preparación del lisado FFPE, tal como se describe en el reverso de esta tarjeta, se acaba de completar, puede omitirse el paso 2 de las instrucciones que se indican a continuación.

- 1 Obtenga un cartucho nuevo y un lisado FFPE preparado para cada muestra que vaya a analizarse.



- 2 Agite el lisado FFPE en el mezclador vórtex durante 15 segundos.



- 3 Abra la tapa del cartucho Xpert.



- 4 Pipetee 520 µl del lisado preparado desde el vial de 5 ml y transfíralo a la cámara de muestra.



- 5 Cierre la tapa del cartucho Xpert.



- 6 Comience el ensayo dentro del plazo especificado en el prospecto.

Procedimiento del ensayo: Preparación del cartucho

Si está utilizando un instrumento GeneXpert Dx

- Inicie el ensayo en los 30 minutos siguientes a la adición de la muestra preparada al cartucho.

Si está utilizando un instrumento GeneXpert Infinity

- Solicite la prueba y ponga el cartucho en la cinta transportadora en los 30 minutos siguientes a la adición de la muestra preparada al cartucho.
- El software Xpertise[®] supervisa la estabilidad en el instrumento restante para que las pruebas se procesen antes de que transcurra el tiempo de caducidad de 6 horas en el instrumento.



Pasos de prueba automáticos del Xpert Breast Cancer STRAT4





Eliminación de residuos

- Las muestras biológicas, los dispositivos de transferencia y los cartuchos usados deben ser considerados capaces de transmitir agentes infecciosos que requieren las precauciones habituales.
- Siga los procedimientos de eliminación de desechos de su centro para la eliminación adecuada de los cartuchos usados y los reactivos no utilizados. Estos materiales pueden exhibir características propias de los residuos químicos peligrosos que requieren procedimientos específicos de eliminación de carácter nacional o regional.
- Si las normativas nacionales o regionales no proporcionan instrucciones claras en cuanto a los procedimientos de eliminación adecuados, las muestras biológicas y los cartuchos utilizados deben desecharse de conformidad con las directrices de la OMS [Organización Mundial de la Salud] en cuanto a la manipulación y eliminación de desechos médicos.

Control de calidad

*Véase el prospecto, donde
encontrará información completa*



Control del sistema del instrumento: Comprobación del estado

- El control del sistema del instrumento comprueba la óptica, la temperatura del módulo y la integridad mecánica de cada cartucho.
 - Si no se superan los controles del sistema, el resultado notificado de la prueba será de ERROR.



Estrategia de control del ensayo Cepheid

- Cada cartucho Xpert es un dispositivo analítico autónomo.
 - Cepheid ha diseñado controles internos que permiten que el sistema detecte modos de fallo específicos dentro de cada cartucho.
 - Control de reactivos: Control de comprobación de la sonda (PCC)
 - Control de adecuación de la muestra: Gen de referencia (CYFIP1)
 - Control interno de Cepheid: Armored RNA (CIC)



Control de comprobación de la sonda (PCC)

- Tras la preparación de la muestra, la reconstitución de las microesferas y el llenado del tubo (antes del termociclado), se realizan varias lecturas de fluorescencia a diferentes temperaturas.
- Las lecturas se comparan con unos valores predeterminados establecidos por Cepheid.
- La comprobación de la sonda controla:
 - La ausencia del reactivo específico de la diana (RST) o de microesferas de reactivo enzimático, que contienen todos los cebadores, las sondas y las plantillas de control interno
 - La reconstitución incompleta del reactivo
 - El relleno incompleto del tubo de reacción
 - La degradación de las sondas
- Si no se supera la comprobación de la sonda, el resultado notificado de la prueba será de ERROR.

Control de adecuación de la muestra SAC

- El control de adecuación de la muestra (SAC) verifica que se han añadido células humanas y ARN humano a la cámara de muestras. El SAC se considera superado si cumple los criterios de aceptación validados.
- Control CYFIP1: Proteína de interacción con FMR1 citoplasmático 1
 - Este gen de referencia se utiliza para normalizar los niveles de expresión de ESR1, PGR, ERBB2 y MKi67.
 - También sirve como control de adecuación de la muestra (SAC), asegurando que la muestra contiene suficiente ARN.
- Para que la prueba arroje un resultado válido es necesaria una señal de CYFIP1 mínima.
- Un SAC negativo puede deberse a:
 - ARN insuficiente
 - Lisis de muestra ineficaz
 - Recogida de muestras incorrecta
 - Mezcla insuficiente de la muestra
- Si el SAC no se supera en una muestra negativa para analito, el resultado notificado de la prueba será de NO VÁLIDO (INVALID).

Control interno de Cepheid (CIC)

- El control interno de Cepheid (CIC) garantiza que la muestra se ha procesado correctamente.
- El CIC es Armored RNA®.
- Verifica que la reacción de RT-PCR se llevó a cabo con un mínimo de inhibición.

Controles externos del STRAT4*

Proveedor	Nombre del control	Descripción	Configuración	Temperatura de conservación
Horizon DX** www.horizondiscovery.com	STRAT4 FFPE Control A	ESR1 POS PGR POS ERBB2 NEG MKi67 POS	Portaobjetos seccionados	4°C
	STRAT4 FFPE Control B	ESR1 POS/NEG PGR POS ERBB2 POS MKi67 POS/NEG	Portaobjetos seccionados	4°C
	STRAT4 FFPE Control C	ESR1 NEG PGR NEG ERBB2 NEG MKi67 POS/NEG	Portaobjetos seccionados	4°C

*Los controles externos están aún en desarrollo.

** **Proveedor alternativo: ATCC**

Aviso: en el caso de las muestras negativas, la ausencia de células humanas provocará un resultado NO VÁLIDO (INVALID)

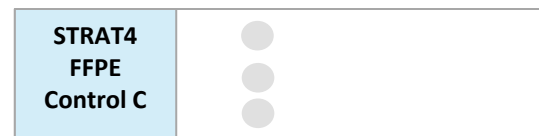
Los controles externos deben utilizarse de acuerdo con los requisitos de las organizaciones de acreditación locales, estatales/provinciales y nacionales, según corresponda.

Configuración del control externo de FFPE STRAT4

	Control de FFPE Xpert Breast Cancer STRAT4		
Dianas	STRAT4 FFPE Control A	STRAT4 FFPE Control B	STRAT4 FFPE Control C
ESR1	pos	pos (cerca del umbral)	neg
PGR	pos	pos	neg
ERBB2	neg	pos	neg
MKi67	pos	pos (cerca del umbral)	pos



Imagen de Cepheid



Paquete:
Controles FFPE, instrucciones, certificado de análisis

Análisis de resultados

*Véase el prospecto, donde
encontrará información completa*



Resultados

- Xpert Breast Cancer STRAT4 proporciona un resultado de prueba POSITIVO (POSITIVE) o NEGATIVO (NEGATIVE) para cada diana.
- El informe final mostrará el resultado individual de cada diana.
- Una diana se considera positiva cuando tiene una sobreexpresión de ARNm en relación con el gen de referencia.
- Para que ESR1 y ERBB2 tengan un resultado válido, el control CYFIP1 debe tener un resultado SUPERADO (PASS).
- Para que PGR y MKi67 tengan un resultado válido, el control CYFIP1 debe tener un resultado SUPERADO (PASS) y la alternativa de CYFIP1 debe ser POS.
- Si la alternativa de CYFIP1 es NEG, PGR y MKi67 serán indeterminados.

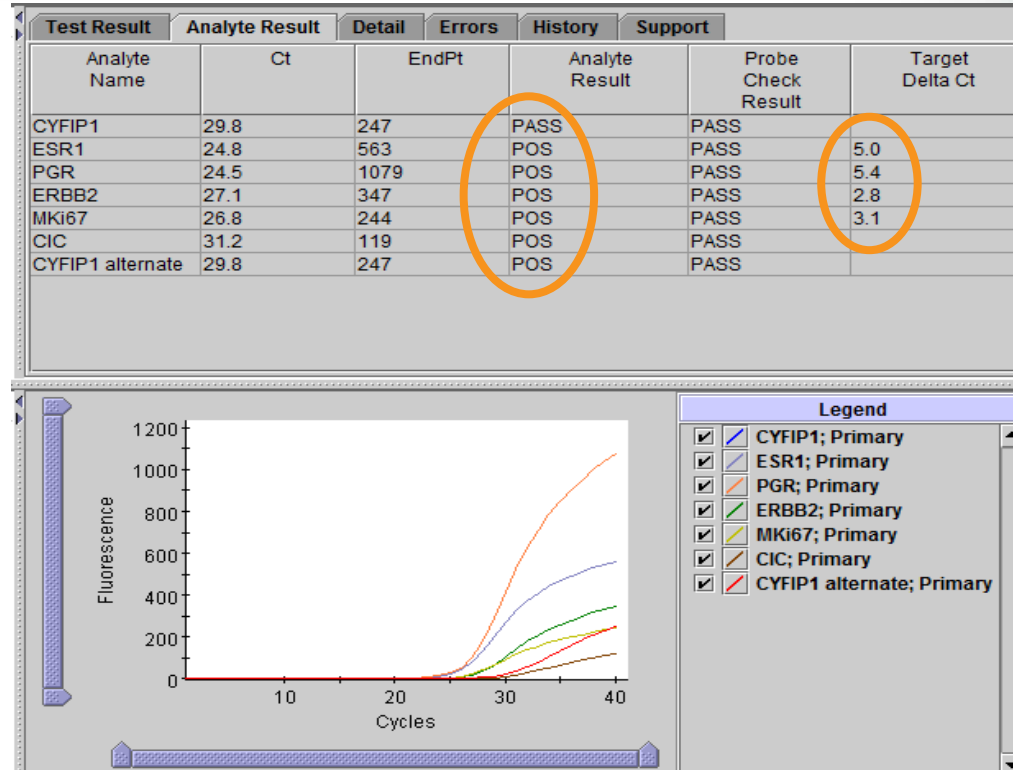
Resumen de resultados

Resultado mostrado	CYFIP1	Alternativa de CYFIP1	CIC
POSITIVO EN ESR1 (ESR1 POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
NEGATIVO EN ESR1 (ESR1 NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
POSITIVO EN PGR (PGR POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
NEGATIVO EN PGR (PGR NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS	POS/NEG
POSITIVO EN ERBB2 (ERBB2 POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
NEGATIVO EN ERBB2 (ERBB2 NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
POSITIVO EN MKi67 (MKi67 POSITIVE)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	POS/NEG
NEGATIVO EN MKi67 (MKi67 NEGATIVE)	SUPERADO (PASS)	POS	POS/NEG
INDETERMINADO EN PGR (PGR INDETERMINATE)	SUPERADO (PASS)	NEG	POS/NEG
INDETERMINADO EN MKi67 (MKi67 INDETERMINATE)	SUPERADO (PASS)	NEG	POS/NEG
REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)	SUPERADO (PASS)	POS/NEG	NEG
NO VÁLIDO (INVALID)	INCORRECTO (FAIL)	NEG	POS/NEG
ERROR	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)
SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)	SIN RESULTADO (NO RESULT)

POSITIVO (POSITIVE)

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

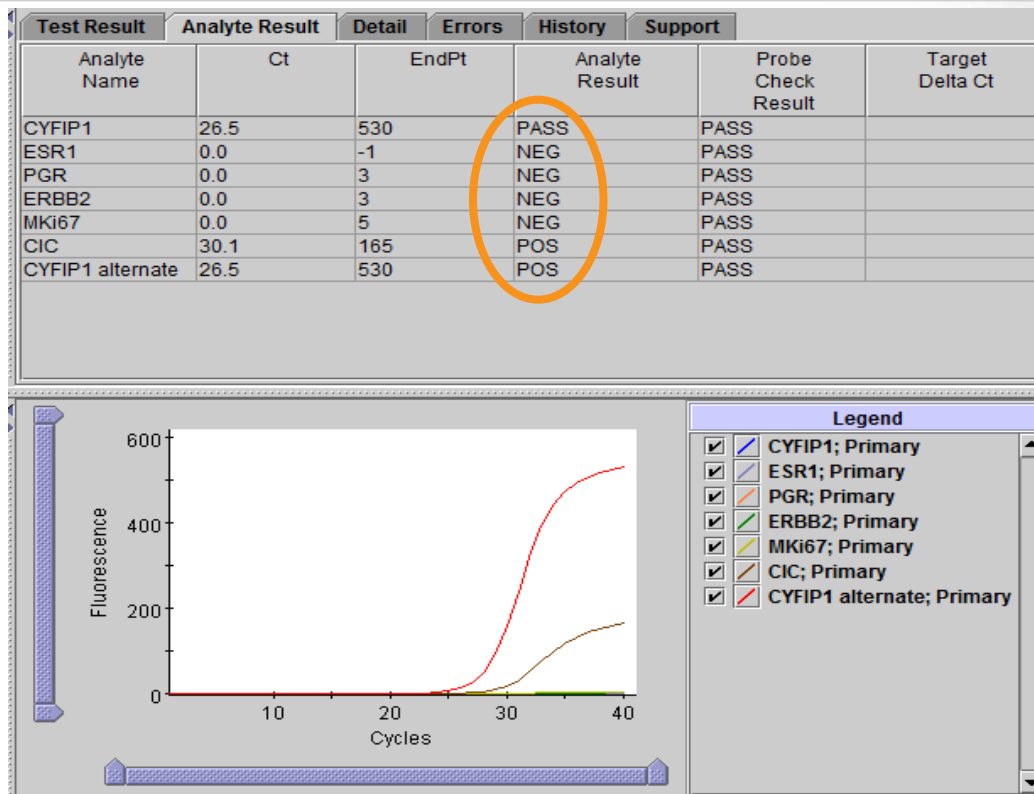
- El transcrito de ARNm diana está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por encima del valor de corte.
- CYFIP1 SUPERADO (PASS); el transcrito de ARNm tiene un umbral de ciclo (Ct) dentro del intervalo válido y su criterio de valoración está por encima del umbral.
- PCC SUPERADO (PASS); todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación



NEGATIVO (NEGATIVE)

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

- El transcrito de ARNm no está sobreexpresado y tiene un umbral de ciclo delta (dCt) por debajo del valor de corte.
- CYFIP1 SUPERADO (PASS); el transcrito de ARNm tiene un Ct dentro del rango válido y un criterio de valoración por encima del valor umbral.
- PCC SUPERADO (PASS); todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación

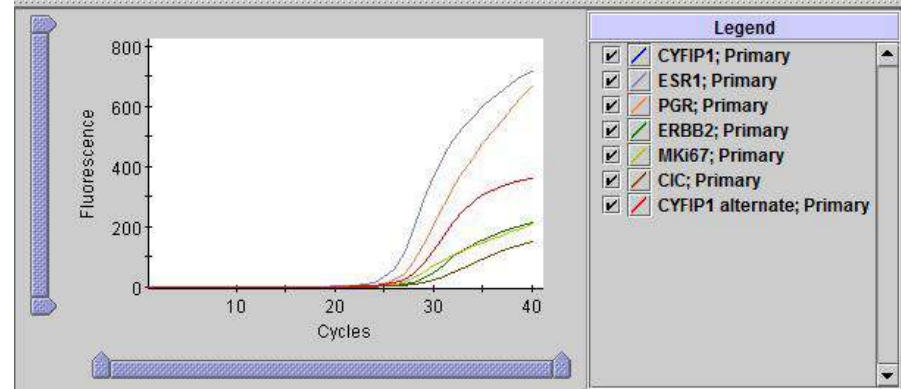


Resultados mixtos

- La diana es positiva o negativa para la sobreexpresión de ARNm respecto al gen de referencia.
- El transcrito de ARNm del CYFIP1 tiene un valor de Ct dentro del rango válido y un criterio de valoración por encima del umbral.
- PCC SUPERADO (PASS); todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación

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	

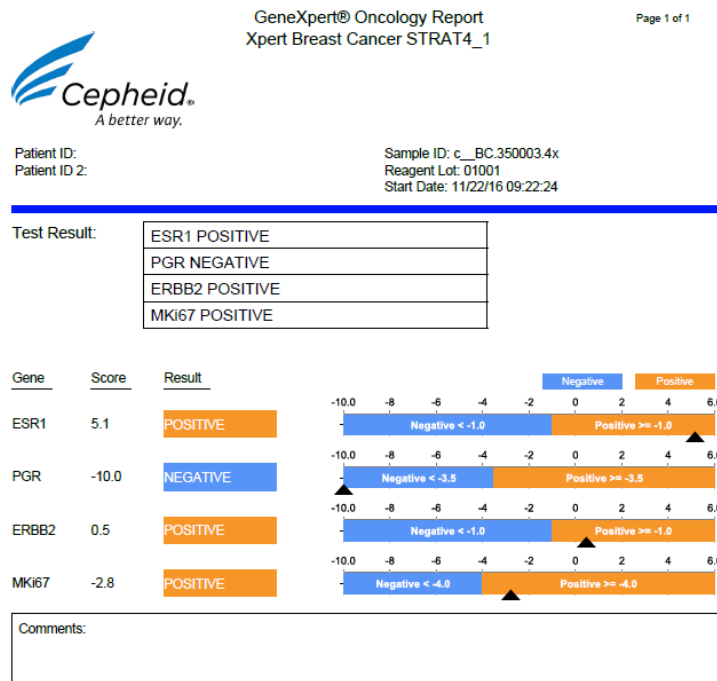


Software ONCore

- El software OnCore se carga en el equipo Gx



- Transfiere los resultados de GxDx o Xpertise a un informe.
- Proporciona una representación gráfica de los datos.
- Muestra la proximidad del resultado de cada diana a los valores de corte.
- Requiere un único archivo .onc, situado en el disco de ADF del ensayo.





Razones para repetir el ensayo con lisado concentrado

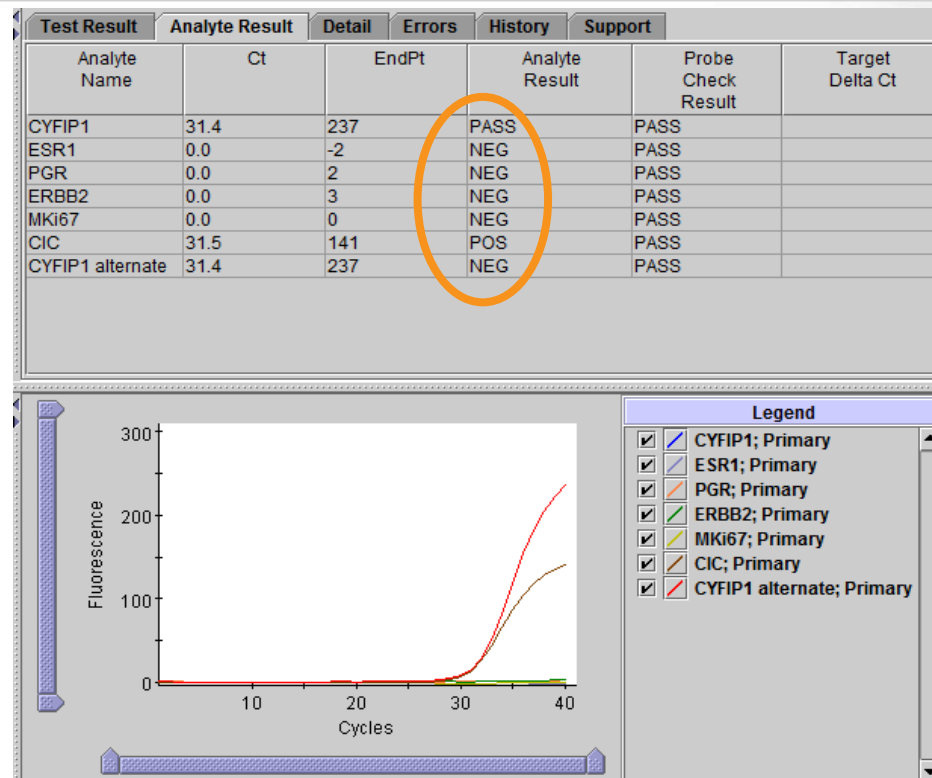
- Un resultado **INDETERMINADO (INDETERMINATE)** indica que la muestra no contenía material suficiente para el análisis de resultados de **PGR y/o MKi67**.
- Un resultado **NO VÁLIDO (INVALID)** indica que el control de referencia no superó la comprobación.
 - La muestra no se procesó correctamente
 - La PCR se inhibió
 - La calidad del ARN en el tumor accedido era inadecuada
- En cualquiera de estos dos casos, repita la prueba con un lisado FFPE más concentrado.

INDETERMINADO (INDETERMINATE)

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

No se pueden determinar los niveles de expresión de ARNm de PGR y/o MKi67.

- Alternativa de CYFIP1 (CYFIP1 alternate) – NEG; el umbral de ciclo (Ct) no estaba dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estaba por debajo del umbral necesario
- PCC SUPERADO (PASS); todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación

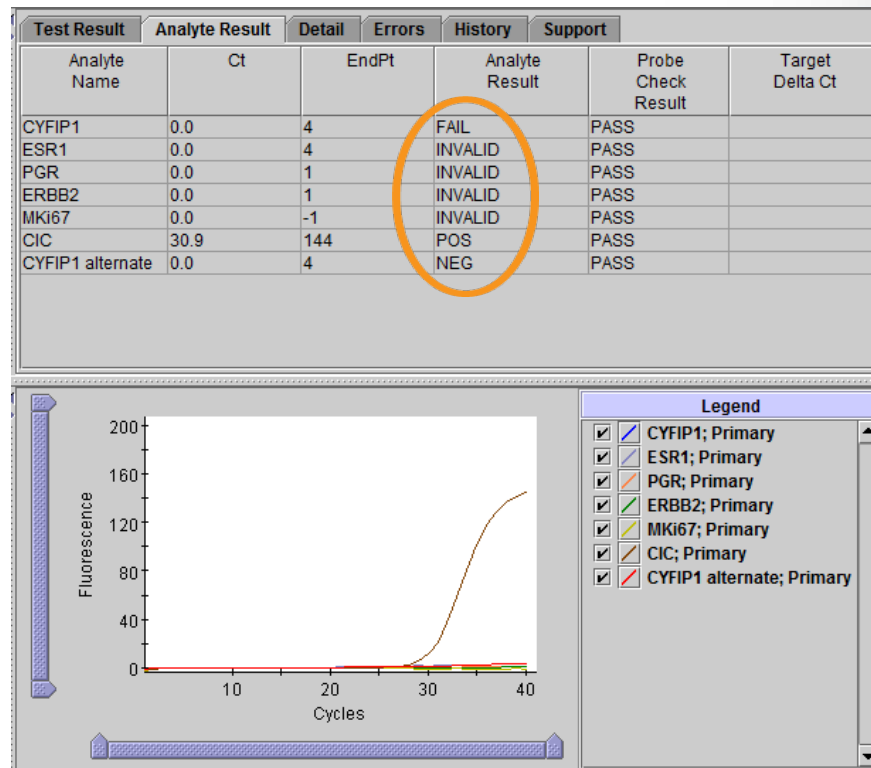


NO VÁLIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**

No se pueden determinar los niveles de ARNm diana.

- CYFIP1 – NO SUPERADO (FAIL); el umbral de ciclo (Ct) no estaba dentro del intervalo válido o el criterio de valoración estaba por debajo del umbral.
- Alternativa de CYFIP1 (CYFIP1 alternate) – NEG
- PCC SUPERADO (PASS); todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación



Procedimiento de repetición de prueba del Xpert Breast Cancer STRAT4 para resultados indeterminado o no válidos

Xpert® Breast Cancer STRAT4 PROCEDIMIENTO DE REPETICIÓN DE PRUEBA para resultados indeterminados o no válidos - Preparación de lisado FFPE concentrado

Consulte el prospecto,
donde encontrará
instrucciones,
precauciones y
advertencias detalladas.

Para obtener un ejemplar
de la SDS (hoja de datos
de seguridad), visite
www.cepheid.com o
www.cepheidinternational.com

Servicio técnico de Cepheid
Oficina en EE.UU.
(888) 838-3222, opción 2
techsupport@cepheid.com

Oficina de Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheidEurope.com



- 1 Raspe la sección de tejido o la macrodissección del portaobjetos.



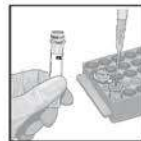
- 2 Transfiera el tejido al tubo de 1,5 ml suministrado.



- 3 Añada 260 µl de reactivo de lisis FFPE al tubo de lisis de 1,5 ml que contiene el tejido FFPE.



- 4 Añada 5 µl de proteinasa K (PK) al mismo tubo de lisis de 1,5 ml. Cierre la tapa.



- 5 Agite en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.



- 6 Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrifuga para desprender el líquido de la tapa.



- 7 Incube la muestra a 80 °C durante 30 minutos.



- 8 Agite en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 5 segundos.



- 9 Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrifuga para desprender el líquido de la tapa.



- 10 Añada 260 µl de etanol ≥ 95 % al mismo tubo de lisis de 1,5 ml.



- 11 Cierre la tapa y agite en el mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 15 segundos.



- 12 Centrifugue brevemente el tubo en la microcentrifuga para desprender el líquido de la tapa.



NOTA: El lisado preparado con etanol es estable entre 2 y 8 °C durante un máximo de 1 semana. A ≤ -20 °C, es estable un máximo de 4 semanas.



Razones para repetir el ensayo con lisado retenido

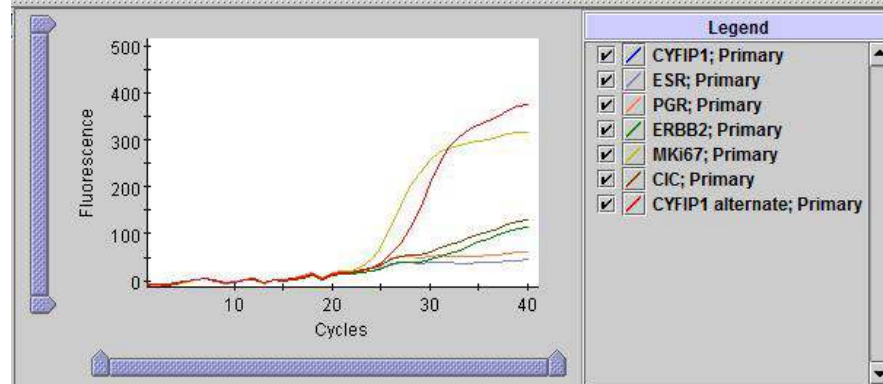
- Un resultado **REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)** indica que el control interno (CIC) no superó la comprobación. La muestra no se procesó correctamente.
- Un resultado de **ERROR** indica que el control de comprobación de la sonda no superó la comprobación debido posiblemente a que el tubo de reacción no se llenó correctamente, a que se detectó un problema de integridad de la sonda de reactivo, a que se excedieron los límites máximos de presión o a que se detectó un error de posición de una válvula.
- **SIN RESULTADO (NO RESULT)** indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detuvo una prueba en curso o si se produjo un corte del suministro eléctrico.
- En ese caso, repita la prueba utilizando una nueva alícuota de 520 μ l del lisado FFPE conservado.

REPETIR PRUEBA (REPEAT TEST)

Test Result REPEAT TEST

- No se pueden determinar los niveles de expresión de los ARNm diana.
- CIC NEG; el control interno tiene un umbral de ciclo (Ct) fuera del intervalo válido.

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	

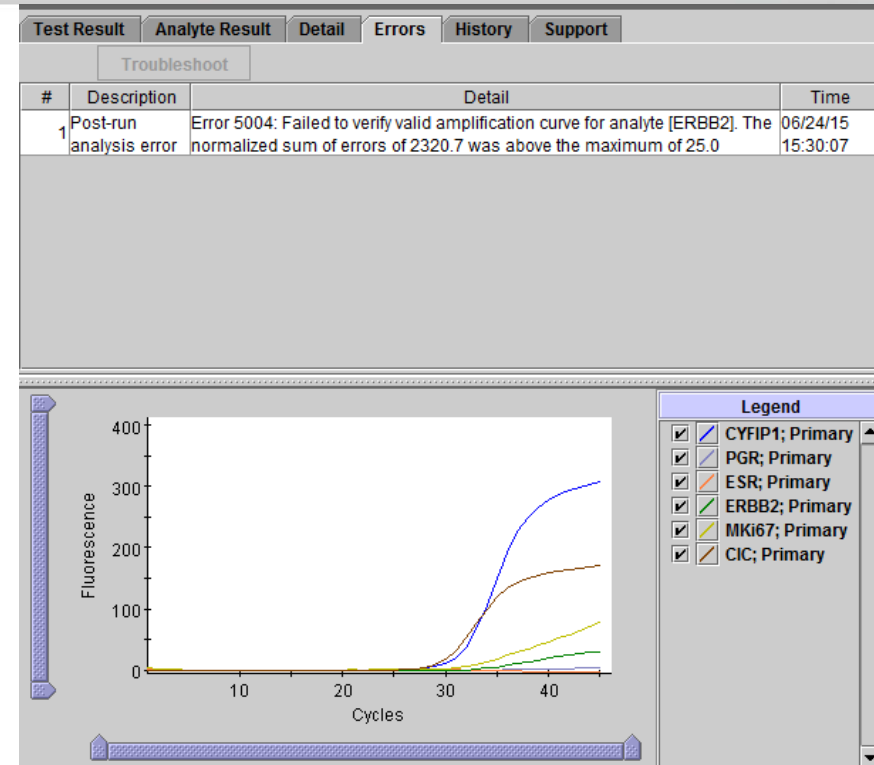


ERROR

Test Result **ERROR**

- No se pueden determinar los niveles de expresión de los ARNm diana.
- Comprobación de la sonda NO SUPERADO (FAIL)*; todos o uno de los resultados de la comprobación de la sonda no han superado la comprobación.

* Si se ha superado la comprobación de la sonda, el error se debe a que el límite máximo de presión ha excedido el intervalo aceptable, a un error en el ajuste de la curva o a que ha fallado un componente del sistema.



SIN RESULTADO (NO RESULT)

Test Result **NO RESULT**

- No se pueden determinar los niveles de ARNm diana.
- SIN RESULTADO (NO RESULT) indica que no se han recogido suficientes datos.
 - Por ejemplo, si el operador detuvo una prueba en curso.
- PCC N/A (NA) (no aplicable).

Test Result	Analyte Result	Detail	Errors	History	Support
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>

Procedimiento de repetición de prueba del Xpert Breast Cancer STRAT4 para resultados Sin resultado (No Result), Repetir prueba (Repeat Test) o Error

Xpert® Breast Cancer STRAT4 PROCEDIMIENTO DE REPETICIÓN DE PRUEBA

para resultados Sin resultado (No Result), Repetir prueba (Repeat Test) o Error



Consulte el prospecto para obtener instrucciones, precauciones y advertencias detalladas.

Para obtener un ejemplar de la SDS (hoja de datos de seguridad), visite www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com

Servicio técnico de Cepheid
Oficina en EE.UU.
(888) 838-3222, opción 2
techsupport@cepheid.com

Oficina de Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheid.eu

1 Obtenga un cartucho nuevo y el lisado FFPE retenido para cada muestra que vaya a analizarse de nuevo.



2 Agite el lisado FFPE en el mezclador vórtex durante 15 segundos.



3 Abra la tapa del cartucho Xpert.



4 Pipetee 520 µl del lisado retenido desde el vial de 5 ml y transféralo a la cámara de muestra.



5 Cierre la tapa del cartucho Xpert.



6 Comience el ensayo dentro del plazo especificado en el prospecto.



Factores que afectan negativamente a los resultados

- **Procesamiento incorrecto de la muestra o del lisado FFPE**
 - Consulte el prospecto para la preparación del lisado.
 - En los ensayos que contienen un control SAC, las muestras que no contengan células humanas arrojarán resultados no válidos si el analito es negativo.
- **Transporte o conservación inadecuados de la muestra recogida o el lisado FFPE**
 - Las condiciones de conservación y transporte son específicas de cada tipo de muestra.
 - Consulte las instrucciones del prospecto para la manipulación adecuada.
- **Procedimiento inadecuado de realización de la prueba**
 - La modificación de los procedimientos de realización de la prueba puede afectar a la eficacia diagnóstica de esta.
 - Los errores técnicos o la confusión de muestras pueden afectar a los resultados de la prueba.
 - Para evitar resultados erróneos es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones del prospecto.
- **Sustancia interferente**
 - Si hay presente alguna sustancia interferente, la prueba puede arrojar resultados negativos falsos o no válidos.
- **Número insuficiente de células humanas o contenido tumoral en la muestra**

Limitaciones

- Véase el prospecto, donde encontrará una lista completa de las limitaciones.



Servicio técnico

- Cepheid ofrece servicio técnico in situ, por teléfono, por fax y por correo electrónico.
- La información de contacto de las oficinas de Cepheid está disponible en nuestro sitio web <http://www.cepheid.com/support>
 - Seleccione la opción Ponerse en contacto con nosotros (Contact Us) para acceder a información de contacto
 - Rellene el formulario en línea para crear un caso de servicio técnico.
- Antes de ponerse en contacto con el servicio técnico de Cepheid, reúna la información siguiente:
 - Nombre del producto
 - Número de lote
 - Número de serie del instrumento
 - Mensajes de error (si los hubiera)
 - Versión de software y, si corresponde, «Service Tag» (número de servicio técnico) del ordenador.

Gracias.



www.Cepheid.com

