

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

REF GXBCSTRAT4-CE-10

Instruções de utilização

IVD CE

Declarações relativas a marcas registadas, patentes e copyright

Cepheid[®], o logótipo da Cepheid, GeneXpert[®], e Xpert[®] são marcas comerciais da Cepheid, registadas nos EUA e noutros países.

Todas as restantes marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários.

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO ATRIBUI AO COMPRADOR O DIREITO NÃO TRANSFERÍVEL DE O UTILIZAR DE ACORDO COM ESTAS INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO. NENHUNS OUTROS DIREITOS SÃO ATRIBUÍDOS EXPRESSAMENTE, POR IMPLICAÇÃO OU POR PRECLUSÃO. ALÉM DISSO, NÃO SE CONFEREM NENHUNS DIREITOS DE REVENDA COM A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO.

© 2017-2023 Cepheid.

Consulte uma descrição das alterações na Histórico de revisões.

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

1 Nome proprietário

Xpert[®] Breast Cancer STRAT4

2 Nome comum ou usual

Xpert Breast CA STRAT4

Xpert BC STRAT4

3 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/HER2*) 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 teste 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.

4 Resumo e explicação

O cancro da mama é um dos cancros mais comuns em mulheres a nível mundial, registando-se cerca de 1,7 milhões de novos casos de cancro da mama por ano.¹ Na Europa, são diagnosticados aproximadamente 494 000 novos casos por ano e morrerão da doença 143 000 doentes. Nos EUA foram diagnosticados cerca de 200 000 novos casos de cancro da mama invasivo em 2015.² A causa mais frequente de mortalidade por cancro em mulheres nos países em vias de desenvolvimento é o cancro da mama, sendo a segunda causa mais frequente de mortalidade por cancro (a seguir ao cancro do pulmão) em mulheres em países desenvolvidos.²

Nas mulheres, o cancro da mama é o cancro mais frequentemente diagnosticado e a maior causa de mortalidade por cancro.¹ A mortalidade por cancro da mama diminuiu 34% desde 1990 em grande parte devido à melhoria do tratamento e à deteção precoce.³ As medições da expressão de proteínas pelo ER e PR são fatores de prognóstico para resultados de cancro da mama e preveem a resposta ao tamoxifeno e a outras terapêuticas hormonais.^{4,5,6,7} A sobre-expressão do HER2 representa um prognóstico adverso em mulheres com cancro mamário. No entanto, a sobre-expressão de proteínas pelo HER2 (*ERBB2*) ou a amplificação do gene HER2 preveem a resposta ao trastuzumab ou a outras terapêuticas hormonais direcionadas para o HER-2.⁸ O marcador de proliferação Ki-67 (*MKi67*) tem sido amplamente estudado em doentes

com cancro da mama principalmente através de estudos retrospectivos,⁹ sendo considerado um importante indicador da necessidade de quimioterapia.¹⁰ Meta-análises do MKi67 demonstraram que este marcador está associado a piores resultados de sobrevida no cancro da mama em fase inicial.¹¹ Devido à importância destes marcadores na seleção de uma terapêutica eficaz para doentes com cancro da mama, a Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) recomenda que todos os carcinomas da mama primários sejam testados em relação a ER, PR, HER2 (ERBB2) e Ki67 aquando do diagnóstico.¹²

A imuno-histoquímica (IHC) é frequentemente utilizada para a medição da expressão de proteínas pelo ER, PR, HER2 e Ki67. No caso da expressão pelo HER2, a IHC é habitualmente o primeiro teste efetuado e os resultados são apresentados numa escala de 0 a 3+. Quando o resultado é ambíguo quanto à expressão pelo HER2 (2+), a amostra é refletida no teste de hibridação in situ (ISH) do HER2, nomeadamente na hibridação fluorescente in situ (FISH) ou na hibridação cromogénica in situ (CISH) que procura a amplificação do gene HER2.¹³ Tem sido demonstrado um elevado grau de variação nos resultados da IHC e ISH em diversos laboratórios, em grande parte devido aos diferentes anticorpos utilizados na IHC, assim como à subjetividade dos métodos de interpretação.¹⁴

O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 é um teste de diagnóstico in vitro utilizado para determinar os níveis de expressão do ARNm do *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67* isolado a partir de amostras FFPE de tecido de cancro da mama invasivo.

O teste é efetuado num cartucho autónomo após um breve passo à parte para preparação do lisado da amostra, exigindo menos de 15 minutos de tempo de intervenção e proporcionando um tempo de realização total inferior a 2 horas.

5 Princípio do procedimento

O ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4 é um ensaio de (PCR) em tempo real para a deteção do ARNm de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67* isolado de tecido de cancro da mama invasivo fixado com formalina e embebido em parafina (FFPE). O ensaio é realizado nos sistemas do instrumento GeneXpert da Cepheid. Os sistemas de instrumento GeneXpert automatizam e integram a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a deteção de sequência-alvo em amostras simples ou complexas utilizando ensaios de RT-PCR em tempo real. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um leitor de código de barras, um computador e software pré-instalado para execução de testes e visualização dos resultados. Os sistemas utilizam cartuchos GeneXpert descartáveis, de utilização única que contêm os reagentes para RT-PCR e onde decorre o processo de RT-PCR. Para uma descrição completa dos sistemas, consulte o manual do utilizador do sistema do instrumento GeneXpert adequado.

O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 inclui reagentes para a deteção simultânea de *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, *MKi67*, um gene de referência da proteína 1 citoplasmática de interação com *FMR1* (*CYFIP1*), um controlo interno de RT-PCR (*CIC*) e um controlo interno de verificação da sonda (*PCC*). O gene de referência verifica a adequação da amostra e é utilizado para normalizar os níveis de expressão do ARNm para o *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67*. O controlo interno de RT-PCR (*CIC*) é utilizado para verificar se a reação de RT-PCR prosseguiu corretamente. O *PCC* verifica a reidratação das esferas de reagente, o enchimento do tubo de RT-PCR, a integridade da sonda e a estabilidade do corante no cartucho. O ensaio utiliza, no total, seis canais fluorescentes distintos para alvo ou deteção do controlo/referência com os seus próprios parâmetros de cut-off para validade do alvo/controlo/referência.

As amostras FFPE têm de ser tratadas primeiro com o Xpert® FFPE Lysis Kit, preparando um corte de tecido de 4 µm-5 µm em que o tecido FFPE é primeiro sujeito a macrodissecção, se necessário, para enriquecer a área do tumor invasivo e depois raspado e colocado num tubo juntamente com os volumes recomendados de reagente de lise FFPE e proteinase K. A solução é depois incubada num bloco de aquecimento a 80 °C durante 30 minutos. Em seguida, a amostra é misturada com etanol e o volume recomendado do lisado de amostra preparado é depois adicionado diretamente a um cartucho de teste. O cartucho de teste é inserido dentro de um módulo de um sistema do instrumento GeneXpert onde a purificação, amplificação e deteção em tempo real de ácidos nucleicos são todas totalmente automatizadas e completamente integradas pelo sistema. Todos os reagentes necessários para a preparação da amostra e análise de RT-PCR no equipamento encontram-se pré-carregados no cartucho. Os ácidos nucleicos no lisado são capturados num filtro, lavados e eluídos por sonicação. O ácido nucleico purificado é misturado com reagentes de RT-PCR secos e a solução é transferida para o tubo de reação para RT-PCR e deteção. O tempo até à obtenção de resultados é de aproximadamente 75 minutos no GeneXpert.

Os cut-offs de deteção que o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 utiliza em cada canal fluorescente foram estabelecidos para maximizar a concordância percentual positiva, negativa e total em comparação com os resultados da IHC ou IHC/FISH para cada alvo provenientes de um laboratório de referência. A IHC para o ER, PR, Ki67 e HER2, bem como a FISH para HER2 foram processadas e classificadas de acordo com as instruções constantes das instruções de utilização. A interpretação dos resultados de foi realizada de acordo com as orientações ASCO/CAP 2013.¹⁵ Os tumores foram classificados como ER ou PRIHC positivos quando $\geq 1\%$ das células tumorais invasivas demonstraram coloração nuclear definitiva, independentemente da intensidade da coloração. A expressão de HER2 foi avaliada no kit (IHC) HercepTest (Dako) e pontuada como 0, 1+, 2+ ou 3+. Os tumores classificados como 2+ refletiram-se por análise FISH para HER2 utilizando o kit de sonda de ADN do HER2 PathVysion (Vysis-Abbott, Chicago, IL). Os casos foram considerados HER2-positivos se pontuados com 3+ por IHC e/ou amplificados por FISH (definido como HER2:CEP17 [rácio $\geq 2,0$]) e/ou

número de cópias HER2 médio $\geq 6,0$ sinais/célula de acordo com a 2013 ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update for HER2 Testing in Breast Cancer.¹⁵ No caso de Ki67, os tumores foram classificados como positivos (altos) quando $\geq 20\%$ das células tumorais invasivas demonstraram coloração nuclear definitiva, independentemente da intensidade da coloração.

No caso do controlo do gene de referência e do controlo interno de RT-PCR, os cut-offs de deteção definem intervalos de valores dos limiares do ciclo (Ct) de PCR mínimo e máximo que determinam um resultado válido, uma entrada mínima de amostra adequada e nenhuma inibição da PCR. No caso dos alvos ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67, os cut-offs de deteção são definidos por variações dos valores do limiar de ciclo (dCt) (Ct do gene de referência menos Ct do gene-alvo) que determinam resultados POSITIVO (POSITIVE) vs. NEGATIVO (NEGATIVE) para um determinado alvo num canal.

6 Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos

O kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contém reagentes suficientes para processar 10 amostras de controlo de qualidade ou lisados FFPE preparados com o Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). O kit Xpert Breast Cancer STRAT4 contém o seguinte:

Cartuchos Xpert Breast Cancer STRAT4 com tubos de reação integrados	10
<ul style="list-style-type: none"> • Esferas 1, 2 e 3 (secas por liofilização) • Reagente de lavagem, • Reagente de eluição, 	<ul style="list-style-type: none"> 1 por cartucho 1,0 ml por cartucho 2,0 ml por cartucho
CD	1 por kit
<ul style="list-style-type: none"> • Ficheiro de definição do teste (Assay Definition File, ADF) • Instruções de utilização • Ficheiros de relatório do ONCore 	

Nota As Fichas de Dados de Segurança (FDS) estão disponíveis em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com, no separador **ASSISTÊNCIA (SUPPORT)**.

Nota A seroalbumina bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida e fabricada a partir de plasma bovino proveniente exclusivamente dos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal e foram aprovados nos testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais animais.

7 Conservação e manuseamento

- Conserve o conteúdo do kit Xpert Breast Cancer STRAT4 a 2 °C-28 °C.
- Não abra a tampa do cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Utilize o cartucho no período de 30 minutos depois de abrir a tampa.
- Não utilize um cartucho com fuga.

8 Materiais necessários mas não fornecidos

- Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10) para preparação do lisado FFPE. Este kit é constituído por reagente de lise FFPE, proteinase K (PK), tubos de 1,5 ml e frascos de 5 ml.
- Agitador de vórtice.

- Pipetas e pontas de pipeta com filtro para aerossóis para pipetar 600 µl, 1,2 µl e 520 µl.
- Computador com software GeneXpert patenteado versão 4.7b ou posterior ou Xpertise versão 6.4b ou posterior, leitor de código de barras e Manual do Utilizador do Sistema do Instrumento GeneXpert (GeneXpert Instrument System operator manual) adequado.
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.

9 Advertências e precauções

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Todas as amostras biológicas devem ser tratadas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Todas as amostras humanas devem ser tratadas com precauções padrão. São disponibilizadas linhas de orientação para manuseamento de amostras pela Organização Mundial da Saúde ou pelos Centros para Controlo e Prevenção de Doenças dos EUA.
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas.
- As características do desempenho deste teste só foram estabelecidas com o tipo de amostra indicado na Secção 3. Não se avaliou o desempenho deste ensaio com outros tipos de amostras.
- O tecido FFPE tem de ser processado com o Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).
- A remoção incompleta (raspagem) da área do tumor da lâmina para preparação do lisado FFPE pode resultar em material insuficiente para o ensaio e, por conseguinte, uma taxa indeterminada/Inválida superior ao previsto com o ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4.
- Não abra a tampa do cartucho do Xpert Breast Cancer STRAT4, exceto ao adicionar o lisado de FFPE preparado.
- Não utilize um cartucho que tiver caído depois de o ter retirado da embalagem.
- Não agite o cartucho. Agitar ou deixar cair o cartucho após a abertura da respetiva tampa pode produzir resultados inválidos.
- Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reação danificado.
- Cada cartucho do Xpert Breast Cancer STRAT4 de utilização única é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- Não utilize um cartucho se este parecer húmido ou se o selo da tampa parecer estar partido.
- Não coloque o rótulo de ID da amostra na tampa do cartucho ou no rótulo do código de barras.
- Recomenda-se o seguimento das boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseamento de amostras de pacientes diferentes para evitar a contaminação de amostras ou de reagentes.
- Consultar os técnicos responsáveis pelos resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não utilizados. Verificar as regulamentações estaduais, territoriais ou locais, uma vez que estas poderão diferir das regulamentações nacionais de eliminação de resíduos. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos, sendo necessário cumprir requisitos de eliminação específicos. As instituições devem verificar os respetivos requisitos de eliminação de resíduos perigosos.

10 Perigos químicos^{16,17}

Este material não é considerado perigoso de acordo com o Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

11 Colheita, transporte e conservação de amostras

- Utilize apenas com amostras FFPE processadas com o Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10). Siga as orientações ASCO/CAP¹⁵ para preparação de tecido FFPE.
- 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) e deve realizar-se a macrodissecção manual, se necessária, antes do teste no teste Xpert Breast Cancer STRAT4. 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.
- O lisado de FFPE deve ser transportado para o laboratório a 2 °C–8 °C.
- O lisado de FFPE é estável até 1 semana a 2 °C–8 °C ou 4 semanas a uma temperatura ≤ -20 °C antes do teste com o ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4. Para conservação a longo prazo, conserve a -80 °C. Não se recomenda mais do que

1 ciclo de congelação/descongelação. Ao descongelar, o lisado FFPE deve ser descongelado à temperatura ambiente e misturado num agitador de vórtice durante 15 segundos antes da utilização.

12 Procedimento

Importante A utilização do cartucho do Xpert Breast Cancer STRAT4 requer a preparação de um lisado com o Xpert FFPE Lysis Kit (n.º de catálogo GXFFPE-LYSIS-CE-10).

Importante Inicie o ensaio dentro de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.

12.1 Preparação do lisado de FFPE

Prepare o lisado de FFPE de acordo com as instruções de utilização do FFPE Lysis Kit.

12.2 Preparação do cartucho

1. Remova o cartucho da embalagem de cartão.
2. Misture o lisado de FFPE preparado num agitador de vórtice durante 15 segundos antes da utilização.
3. Abra a tampa do cartucho.
4. Com uma pipeta, transfira 520 µl do lisado de FFPE para a câmara de amostra do cartucho. (Tenha em atenção que poderá existir uma pequena quantidade de precipitado, que não afeta o desempenho do ensaio).

Guarde o lisado de FFPE restante a uma temperatura de 2 °C–8 °C ou ≤ –20 °C, caso seja necessário repetir o teste.



Figura 1. Cartucho do Xpert Breast Cancer STRAT4 (vista de cima)

5. Fechar a tampa do cartucho. Certifique-se de que a tampa fica bem fechada.

12.3 Iniciar o teste

Importante Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o ficheiro de definição do ensaio (Assay Definition File, ADF) do Xpert Breast Cancer STRAT4 foi importado para o software.

Esta secção enumera os passos predefinidos para utilizar o sistema GeneXpert. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)* ou o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Infinity (GeneXpert Infinity System Operator Manual)*, dependendo do instrumento que está a ser utilizado.

Nota Os passos a seguir poderão ser diferentes se o administrador do sistema tiver alterado o fluxo de trabalho predefinido do sistema.

1. Ligue o instrumento GeneXpert:

- Se estiver a utilizar o instrumento GeneXpert Dx, comece por ligar o instrumento GeneXpert Dx e, de seguida, o computador. O software GeneXpert irá iniciar-se automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone de atalho do software GeneXpert Dx no ambiente de trabalho do Windows®.
- ou
- Se estiver a utilizar o instrumento GeneXpert Infinity, ative o instrumento. O software Xpertise iniciará automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone do software Xpertise no ambiente de trabalho do Windows.
2. Inicie sessão no software do sistema do instrumento GeneXpert utilizando o seu nome de utilizador e palavra-passe. Na janela do sistema GeneXpert Dx, clique em **Criar teste (Create Test)** (GeneXpert Dx) ou clique em **Pedidos (Orders)** e **Pedir teste (Order Test)** (Infinity). Aparece a janela Criar teste (Create Test).
 3. Leia ou introduza a ID da amostra (Sample ID). Se digitar a ID da amostra (Sample ID), assegure-se de que digita a ID da amostra correta. A ID da amostra (Sample ID) é associada aos resultados do teste e é mostrada na janela Ver resultados (View Results) e em todos os relatórios. Aparece a caixa de diálogo Ler cartucho (Scan Cartridge).
 4. Leia o código de barras do cartucho do Xpert Breast Cancer STRAT4. Aparece a janela Criar teste (Create Test). Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas para os seguintes campos: Selecionar ensaio (Select Assay), ID de lote de reagente (Reagent Lot ID), Número de série do cartucho (Cartridge SN).
 5. Clique em **Iniciar o teste (Start Test)** (GeneXpert Dx) ou **Submeter (Submit)** (Infinity). Introduza a sua palavra-passe se lhe for solicitada.
 6. No caso do instrumento GeneXpert Dx:
 - a) Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
 - b) Feche a porta. O teste começa e a luz verde para de piscar. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
 - c) Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo. Retire o cartucho.
 - d) Elimine os cartuchos usados nos recipientes para resíduos de amostras apropriados, de acordo com as práticas padrão da sua instituição. Ver Secção 9.

ou

Para o sistema GeneXpert Infinity, coloque o cartucho no tapete rolante. O cartucho será automaticamente carregado, o teste será executado e o cartucho usado será colocado no recipiente para resíduos.

13 Visualização e impressão de resultados

Esta secção discrimina os passos básicos para a visualização e a impressão dos resultados. Para obter instruções mais detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados consulte o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)* ou o *Manual do Utilizador do Sistema GeneXpert Infinity (GeneXpert Infinity System Operator Manual)*, dependendo do instrumento utilizado.

1. Clique no **Consulta de resultados (View Results)** Ícone Consulta de resultados (View results)
2. Após conclusão do ensaio, clique no botão **Relatório (Report)** no ecrã Consultar resultados (View Results) para visualizar e/ou gerar um relatório em ficheiro PDF.

Nota Se utilizar o software ONCore para gerar um relatório, consulte as instruções no Manual de utilização do software GeneXpert ONCore (GeneXpert ONCore Software User Guide) que está disponível no CD do manual de instruções do ONCore (ONCore User Guide CD). Consulte também as Instruções de relatório do ONCore no CD do Xpert Breast Cancer STRAT4 para obter instruções sobre a interpretação do relatório do ONCore para o ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4.

14 Controlo de qualidade

Cada teste contém um controlo de gene de referência (*CYFIP1*) e um controlo de verificação da sonda (PCC).

- **Controlo CYFIP1:** este gene de referência é utilizado para normalizar os níveis de expressão para o *ESRI*, *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 sinal de *CYFIP1* abaixo da quantidade mínima ou um sinal negativo indica que a amostra não contém ARN suficiente.

- ***CYFIP1* alternativo:** é um controlo *CYFIP1* duplicado utilizado no algoritmo quando o limiar do ciclo de variação (dCt) do PGR ou *MKi67* está abaixo da definição de cut-off do ensaio. Para estes alvos, é necessário um sinal alternativo de *CYFIP1* mínimo adicional para se obter um resultado de teste válido.
- **Controlo de verificação da sonda (PCC):** Antes do início da PCR, o sistema do instrumento GeneXpert mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. O PCC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.
- **Controlos externos (não fornecidos):** Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estaduais e federais, conforme aplicável.

15 Interpretação dos resultados

Os resultados são automaticamente interpretados pelo sistema do instrumento GeneXpert através da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados e são apresentados com clareza na janela Ver resultados (View Results) nos separadores Resultados do teste (Test Results) e Resultados do analito (Analyte Results). O resultado do teste e os resultados do analito também são mostrados no relatório de teste. Os resultados possíveis são apresentados na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1. Todos os resultados possíveis para o teste Xpert Breast Cancer STRAT4

Resultado apresentado	CYFIP1	CYFIP1 alternativo	CIC
<i>ESR1</i> POSITIVO (<i>ESR1</i> POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>ESR1</i> NEGATIVO (<i>ESR1</i> NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>PGR</i> POSITIVO (<i>PGR</i> POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>PGR</i> NEGATIVO (<i>PGR</i> NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT.	POSIT ou NEGAT
<i>ERBB2</i> POSITIVO (<i>ERBB2</i> POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>ERBB2</i> NEGATIVO (<i>ERBB2</i> NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>MKi67</i> POSITIVO (<i>MKi67</i> POSITIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	POSIT ou NEGAT
<i>MKi67</i> NEGATIVO (<i>MKi67</i> NEGATIVE)	APROVADO (PASS)	POSIT.	POSIT ou NEGAT
<i>PGR</i> INDETERMINADO (<i>PGR</i> INDETERMINATE)	APROVADO (PASS)	NEGAT.	POSIT ou NEGAT
<i>MKi67</i> INDETERMINADO (<i>MKi67</i> INDETERMINATE)	APROVADO (PASS)	NEGAT.	POSIT ou NEGAT
REPETIR TESTE (REPEAT TEST)	APROVADO (PASS)	POSIT ou NEGAT	NEGAT.
INVÁLIDO (INVALID)	NÃO APROVADO (FAIL)	NEGAT.	POSIT ou NEGAT
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)

Tabela 2. Resultados representativos e interpretação do Xpert Breast Cancer STRAT4

Resultado	Interpretação
<p>ESR1 POSITIVO (ESR1 POSITIVE)</p> <p>Ver Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>ESR1</i> apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) acima da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>PGR POSITIVO (PGR POSITIVE)</p> <p>Ver Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>PGR</i> apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) acima da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>ERBB2 POSITIVO (ERBB2 POSITIVE)</p> <p>Ver Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>ERBB2</i> apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) acima da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>MKi67 POSITIVO (MKi67 POSITIVE)</p> <p>Ver Figura 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>MKi67</i> apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) acima da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>ESR1 - NEGATIVO (ESR1 - NEGATIVE)</p> <p>Ver Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>ESR1</i> não apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) abaixo da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>PGR NEGATIVO (PGR NEGATIVE)</p> <p>Ver Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>PGR</i> não apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) abaixo da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS; o <i>CYFIP1</i> tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.

Resultado	Interpretação
<p>ERBB2 NEGATIVO (ERBB2 NEGATIVE)</p> <p>Ver Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>ERBB2</i> não apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) abaixo da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>MKi67 NEGATIVO (MKi67 NEGATIVE)</p> <p>Ver Figura 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O transcrito de ARNm do <i>MKi67</i> não apresenta sobre-expressão e tem um limiar do ciclo de variação (dCt) abaixo da definição de cut-off. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS; o <i>CYFIP1</i> tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>PGR indeterminado (PGR Indeterminate)</p> <p>Ver Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível determinar o nível de expressão do ARNm do <i>PGR</i> devido à amostra conter material insuficiente. Repita o teste utilizando um lisado mais concentrado. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG; o limiar de ciclo (Ct) do <i>CYFIP1</i> não se situava dentro do intervalo válido ou o endpoint estava abaixo da definição de limiar necessária para a determinação do estado de PGR. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>MKi67 indeterminado (MKi67 Indeterminate)</p> <p>Ver Figura 4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível determinar o nível de expressão do ARNm do <i>MKi67</i> devido à amostra conter material insuficiente. Repita o teste utilizando um lisado mais concentrado. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG; o limiar de ciclo (Ct) do <i>CYFIP1</i> não se situava dentro do intervalo válido ou o endpoint estava abaixo da definição de limiar necessária para a determinação do estado de MKi67. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
<p>REPETIR TESTE (REPEAT TEST)</p> <p>Ver Figura 5.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível determinar os níveis de expressão do ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Repita o teste utilizando uma alíquota de lisado da amostra FFPE guardada. • <i>CYFIP1</i> – APROVADO (PASS); o transcrito de ARNm do <i>CYFIP1</i> foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • <i>CYFIP1</i> alternativo – POS/NEG; o transcrito de mARN do <i>CYFIP1</i> foi detetado. O transcrito pode ou não ter um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • CIC – NEG; o controlo interno tem um limiar de ciclo (Ct) fora do intervalo válido. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.

Resultado	Interpretação
INVÁLIDO (INVALID)	<ul style="list-style-type: none"> • INVÁLIDO (INVALID) – não é possível determinar os níveis de expressão do ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> devido à amostra conter material insuficiente. Repita o teste utilizando um lisado mais concentrado. • <i>CYFIP1</i> – FALHOU (FAIL); o limiar de ciclo (Ct) do <i>CYFIP1</i> não estava dentro do intervalo válido nem o endpoint estava abaixo da definição de limiar. • <i>CYFIP1</i> alternativo – NEG; o limiar de ciclo (Ct) do <i>CYFIP1</i> não estava dentro do intervalo válido nem o endpoint estava abaixo da definição de limiar. • Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
ERRO (ERROR)	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível determinar os níveis de expressão do ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Repita o teste utilizando uma alíquota de lisado da amostra FFPE guardada. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – SEM RESULTADO (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativo – SEM RESULTADO (NO RESULT) • Verificação da sonda – APROVADO*/FALHOU (PASS*/FAIL); um ou todos os resultados de verificação da sonda falharam. <p style="margin-left: 20px;">* 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.</p>
SEM RESULTADO (NO RESULT)	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível determinar os níveis de expressão do ARNm de <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i>. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste. Isto pode ocorrer, por exemplo, se o utilizador parou um teste que estava em curso. Repita o teste utilizando o lisado da amostra FFPE guardado. • <i>ESR1/PGR/ERBB2/MKi67</i> – SEM RESULTADO (NO RESULT) • <i>CYFIP1/CYFIP1</i> alternativo – SEM RESULTADO (NO RESULT) • Verificação da sonda — NA (não aplicável) (NA [not applicable])

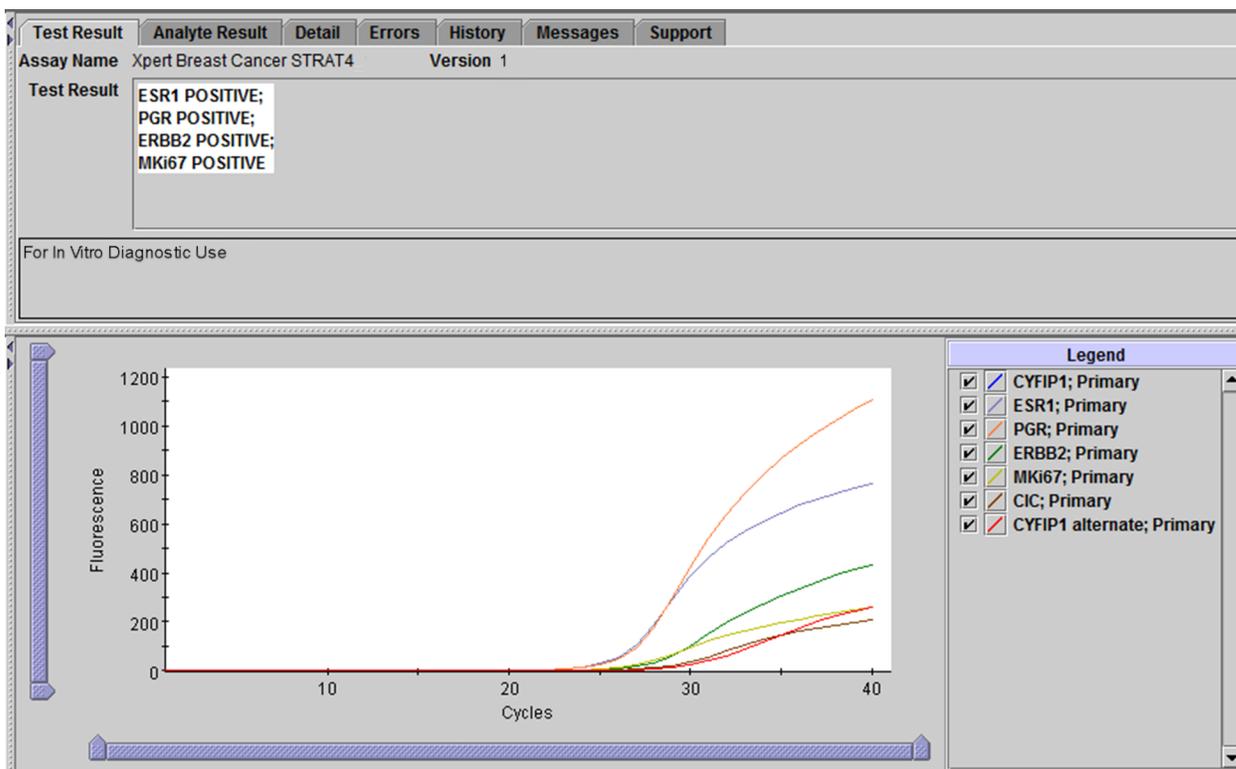


Figura 2. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVO (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVE)

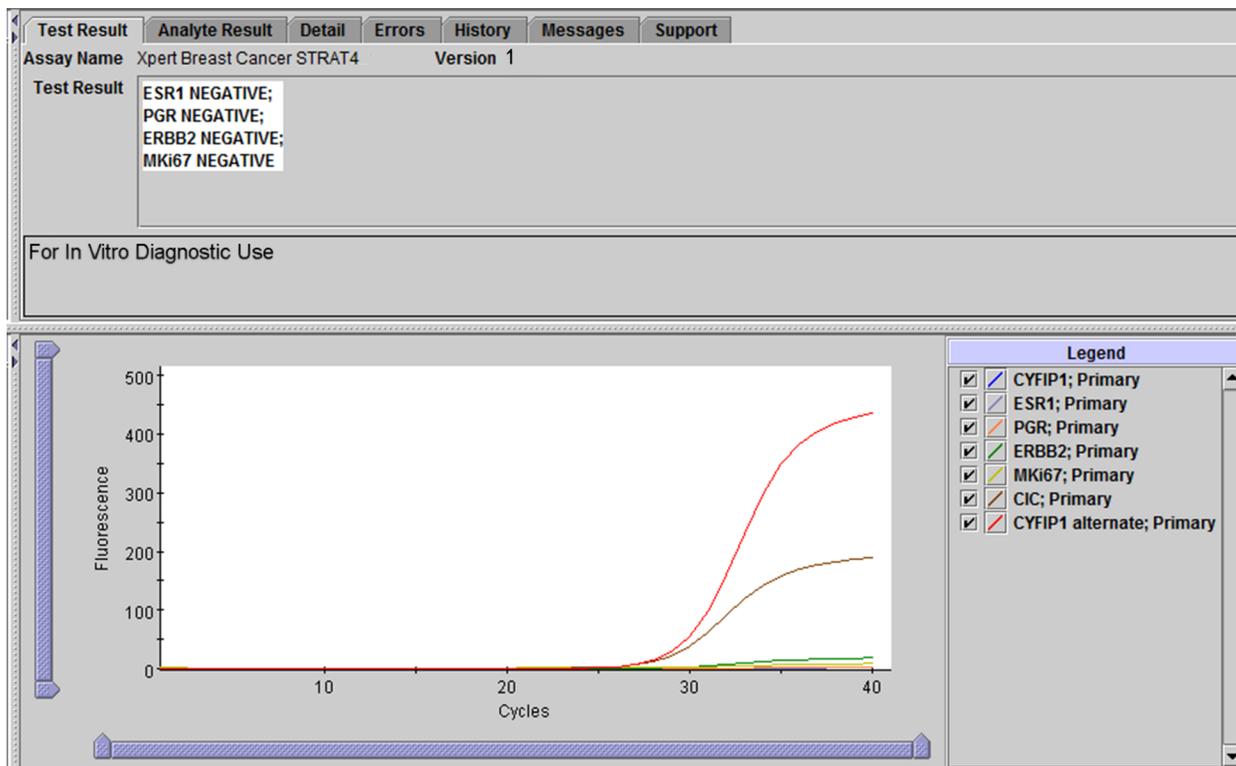


Figura 3. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVO (ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVE)

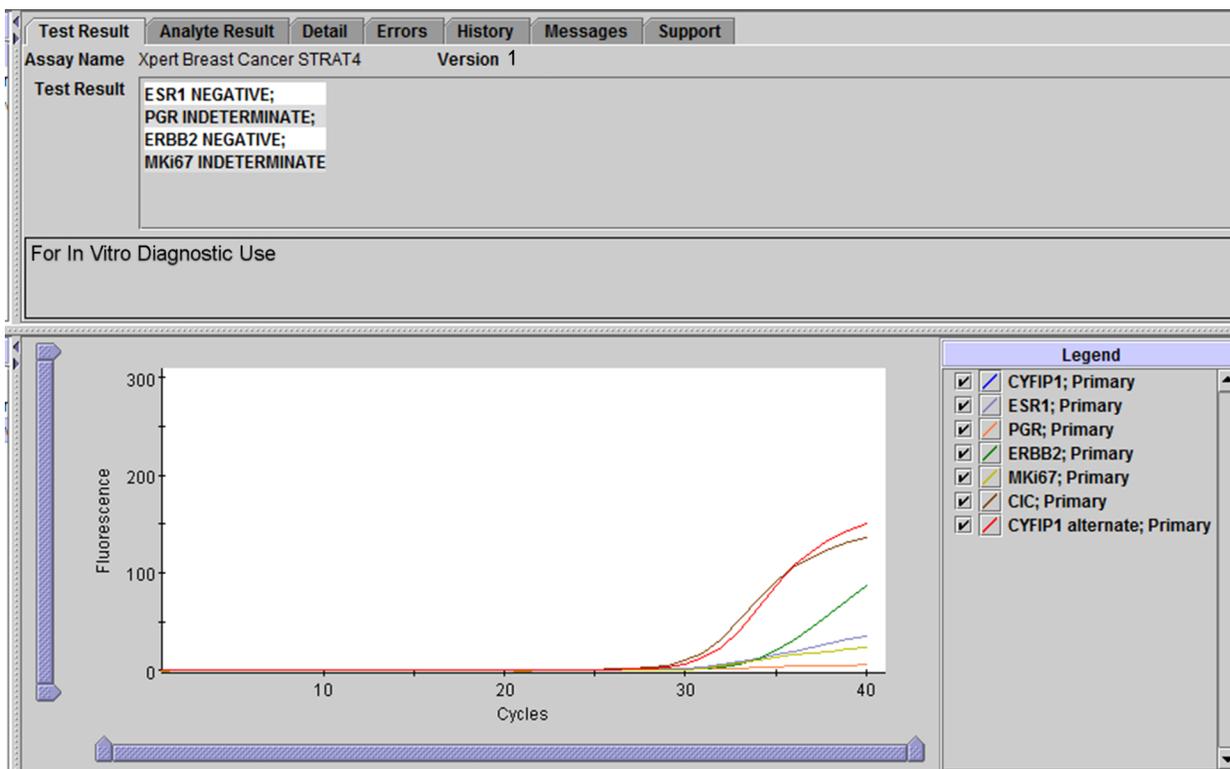


Figura 4. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: PGR/ MKi67 INDETERMINADO (PGR/MKi67 INDETERMINATE)

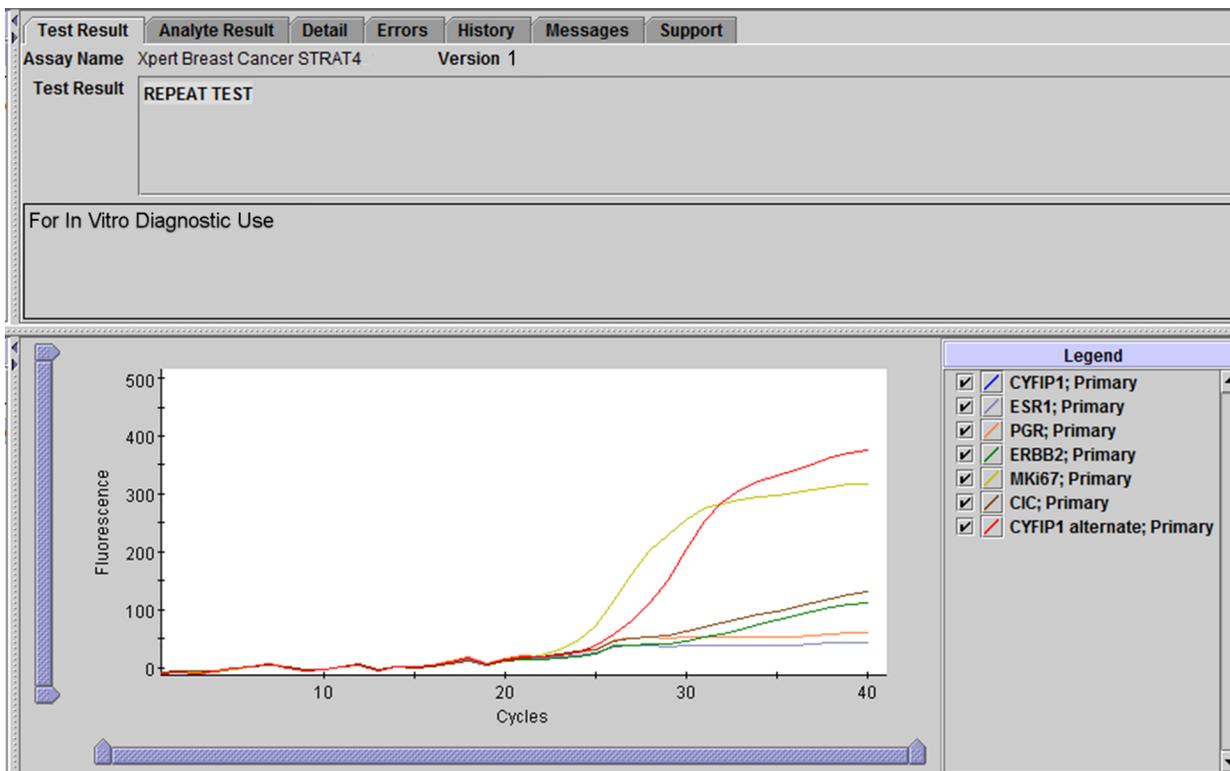


Figura 5. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: REPETIR TESTE (REPEAT TEST)

16 Motivos para repetir o teste

Repita o teste com um cartucho novo (não reutilize o cartucho).

- Um resultado **REPETIR TESTE (REPEAT TEST)** indica que o controlo interno falhou. A amostra não foi processada adequadamente. Neste caso, repita o teste utilizando uma nova alíquota de 520 µl do mesmo lisado de FFPE guardado.
- Um resultado **INVÁLIDO (INVALID)** indica que o controlo de referência falhou. A amostra não foi adequadamente processada, a PCR foi inibida ou a qualidade do ARN do tumor obtido era inadequada. Neste caso, repita o teste com um lisado de FFPE mais concentrado de acordo com as instruções constantes das instruções de utilização do FFPE Lysis Kit.
- Um resultado **ERRO (ERROR)** indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado, 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. Neste caso, repita o teste utilizando uma nova alíquota de 520 µl do mesmo lisado de FFPE guardado.
- **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. Neste caso, repita o teste utilizando uma nova alíquota de 520 µl do mesmo lisado de FFPE guardado.
- Se o desempenho do CQ externo não for o esperado, repita o teste de controlo externo e/ou contacte a Cepheid para assistência.

17 Limitações

- Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste. Os resultados do Xpert Breast Cancer STRAT4 devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos à disposição do médico.
- O desempenho do Xpert Breast Cancer STRAT4 foi validado utilizando os procedimentos indicados nestas instruções de utilização com amostras FFPE com cinco a dez anos de idade.
- O desempenho do Xpert Breast Cancer STRAT4 foi validado utilizando apenas os procedimentos detalhados nestas instruções de utilização.
- Podem ocorrer resultados de teste erróneos devido a incorreções na colheita, no manuseamento ou na conservação das amostras ou devido a troca de amostras. O cumprimento cuidadoso das instruções constantes destas instruções de utilização é necessário para evitar resultados errados.
- Não foram estabelecidas características do desempenho para doentes com menos de 25 anos de idade.
- Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de iniciadores ou sondas podem resultar em resultados incorretos mas credíveis para *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* e *MKi67*.

18 Características do desempenho

18.1 Desempenho clínico

As características do desempenho do teste Xpert Breast Cancer STRAT4 foram avaliadas em relação aos resultados da IHC para o ER, PR, HER2 e Ki67 e à hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para a amplificação do gene HER2 em locais nos EUA e na UE. Inicialmente, foi incluído neste estudo um total de 211 amostras FFPE de tumores primários de cancro da mama invasivo restantes sem identificação nos EUA e na UE. Foram excluídas dez (10) amostras devido a quantidade insuficiente de tumor indisponível para os testes e uma amostra devido a revogação do consentimento. Deste modo, foi incluído nas análises de dados um total de 200 amostras disponíveis. Para cada amostra FFPE, foram preparadas várias lâminas para o ensaio Xpert, para a IHC para o ER, PR, HER2 e Ki67 e para a FISH para amplificação do gene HER2.

De modo geral, o Xpert Breast Cancer STRAT4 forneceu resultados válidos à primeira tentativa em 99,5% (199/200) das amostras do estudo, com uma amostra com resultado inicialmente não determinado (**ERRO [ERROR]**, **INVÁLIDO [INVALID]** ou **SEM RESULTADO [NO RESULT]**) produziu um resultado de teste após uma única repetição do teste. A taxa global de sucesso do ensaio foi de 100,0% (200/200).

Das 200 amostras com resultados de teste Xpert válidos, os resultados dos testes de ESR1 e ERBB2 foram um positivo válido ou um negativo válido 100% das vezes (200/200). Para o PGR e o MKi67, o Xpert teve um resultado de teste positivo válido ou negativo válido 98,5% (197/200) e 97,0% das vezes (194/200), respetivamente. As sete (7) amostras com resultados de Xpert indeterminados para PGR e/ou MKi67 foram novamente testadas utilizando o método de lisado de FFPE concentrado. Os resultados dos testes iniciais (primeira tentativa e das repetições do teste estão apresentados na Tabela 3.

Em geral, no conjunto de dados, incluindo os resultados da repetição dos testes, o Xpert Breast Cancer STRAT4 demonstrou uma concordância percentual positiva (PPA) de 97,2%, uma concordância percentual negativa (NPA) de 95,0% e uma concordância percentual global (OPA) de 97,0% para o ESR1 relativo à IHC¹⁸; PPA de 88,4%, NPA de 90,7% e OPA de 88,9% para o PGR relativo à IHC¹⁸; PPA de 100,0%, NPA de 92,4% e OPA de 93,3% para o ERBB2 relativo à IHC¹⁹ e PPA de 100%, NPA de 92,0% e OPA de 93,3% para o ERBB2 relativo ao HER2 na FISH.¹⁹ Para o MKi67, uma PPA de 88,8%, NPA de 100% e OPA de 90,7% com o limiar de IHC definido em > 20% para positivo e em < 10% para negativo. Amostras intermédias do MKi67 na IHC (limiar 10%-20%, inclusive) foram excluídas da análise. A PPA, NPA e OPA globais para cada alvo são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Desempenho clínico

Comparação	Conjunto de dados ^a	Total (n) ^b	CCP	IC de 95%	CNP	IC de 95%	OPA	IC de 95%
ESR1/ER Xpert vs. IHC	Original	199	97,2% (174/179)	93,6-98,8	100% (20/20)	83,9-100	97,5% (194/199)	94,3-98,9
	Repetição de um teste	199	97,2% (174/179)	93,6-98,8	95,0% (19/20)	76,4-99,1	97,0% (193/199)	93,6-98,6
PGR/PR Xpert vs. IHC	Original	196	89,0% (137/154)	83,0-93,0	92,9% (39/42)	81,0-97,5	89,8% (176/196)	84,8-93,3
	Repetição de um teste	198	88,4% (137/155)	82,4-92,5	90,7% (39/43)	78,4-96,3	88,9% (176/198)	83,8-92,5
ERBB2/HER2 Xpert vs. IHC	Original	180	100% (22/22)	85,1-100	92,4% (146/158)	87,2-95,6	93,3% (168/180)	88,7-96,1
	Repetição de um teste	180	100% (22/22)	85,1-100	92,4% (146/158)	87,2-95,6	93,3% (168/180)	88,7-96,1
ERBB2/HER2 Xpert vs. FISH	Original	178	100% (28/28)	87,9-100	92,0% (138/150)	86,5-95,4	93,3% (166/178)	88,6-96,1
	Repetição de um teste	178	100% (28/28)	87,9-100	92,0% (138/150)	86,5-95,4	93,3% (166/178)	88,6-96,1
ERBB2/HER2 Xpert vs. IHC + FISH	Original	197	100% (27/27)	87,5-100	91,2% (155/170)	86,0-94,6	92,4% (182/197)	87,8-95,3
	Repetição de um teste	197	100% (27/27)	87,5-100	91,2% (155/170)	86,0-94,6	92,4% (182/197)	87,8-95,3
MKi67/Ki67 Xpert vs. IHC	Original	148	88,7% (110/124)	81,9-93,2	100% (24/24)	86,2-100	90,5% (134/148)	84,7-94,3
	Repetição de um teste	151	88,8% (111/125)	82,1-93,2	100% (26/26)	87,1-100	90,7% (137/151)	85,0-94,4

^a Original = lisado 1X de acordo com as instruções das instruções de utilização; Repetição do teste = resultado da repetição do teste num lisado concentrado 4X nos casos em que a amostra original (lisado 1X) produziu um resultado indeterminado para PGR e/ou MKi67.

^b As amostras com resultados Xpert não determinados ou indeterminados, as amostras com resultados de IHC ambíguos ou intermédios e amostras com falha na IHC e falha na FISH foram excluídas.

19 Desempenho analítico

19.1 Sensibilidade analítica/entrada mínima para o ensaio

A entrada mínima para o ensaio foi determinada avaliando o Ct do CYFIP1 máximo (gene de referência) que determina com exatidão a entrada de amostra necessária para um desempenho de ensaio sólido. Esta entrada de amostra assegura a obtenção de resultados válidos na maior parte das amostras FFPE clínicas testadas. Amostras com um valor de Ct do CYFIP1 superior ao permitido produzirão um resultado **INVÁLIDO (INVALID)**.

A sensibilidade analítica/entrada mínima para o ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4, definida como o Ct do CYFIP1 máximo que produz $\geq 95\%$ de resultados válidos, foi estabelecida utilizando diluições de lisados de amostras clínicas FFPE para desafiar o Ct do CYFIP1. Para avaliar a sensibilidade do Ct do CYFIP1, um lisado de amostra clínica FFPE foi diluído

em série e testado com N = 20 réplicas por nível de diluição em 3 dias até $\leq 95\%$ dos resultados do teste serem válidos. Os níveis de diluição incluíram uma amostra na entrada mínima para o ensaio esperada, dois níveis abaixo e dois níveis acima. O teste foi realizado em dois lotes de cartuchos do Xpert Breast Cancer STRAT4.

Antes do início do estudo, foi realizado um teste de limite do branco com N = 60 réplicas utilizando dois lotes independentes de cartuchos do Xpert Breast Cancer STRAT4. O limite da amostra do branco consistiu num corte de parafina do branco (nenhuma amostra de tecido), tendo todos os resultados de teste demonstrado resultados INVÁLIDO (**INVÁLIDO (INVALID)**) esperados. Diluições em série da entrada da amostra clínica do tecido FFPE a 1/1000 produziram 20/20 Ct do CYFIP1 válidos com Ct médio = 33,4 e DP de 0,6 do lote 1 do ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4 e Ct médio = 33,6 e DP de 0,5 do lote 2. Diluições adicionais com valores de Ct do CYFIP1 posteriores não satisfizerem a percentagem $\geq 95\%$ de resultados válidos necessária para o estudo. A Tabela 4 resume o número de execuções de teste válidas em cada nível de entrada da amostra diluída em série como diluição relativa ou Ct de CYFIP1 média. A sensibilidade analítica com dois lotes dos cartuchos do ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4 demonstraram um requisito de entrada mínima para o ensaio de Ct do CYFIP1 = 33,4. Este valor combinado com a variabilidade do ensaio permitirá que o limite superior de Ct do CYFIP1 = 35 seja definido para o ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4.

Tabela 4. Entrada mínima para o ensaio no Xpert Breast Cancer STRAT4

Lote do kit	Entrada da amostra (Diluição relativa)	Ct de CYFIP1 média	DP	Execução válida N (Ct \leq 35)
00801 (Lote 1)	1/20	27,6	0,4	20/20
	1/100	29,8	0,3	20/20
	1/1000	33,4	0,6	20/20
	1/2000	34,2	0,5	9/20
	1/4000	34,5	0,5	2/20
	SCM	n. a.	n. a.	0/20
00903 (Lote 2)	1/20	27,8	0,3	20/20
	1/100	30,0	0,3	20/20
	1/1000	33,6	0,5	20/20
	1/2000	34,2	0,4	9/20
	1/4000	34,6	0,0	1/20
	SCM	n. a.	n. a.	0/20

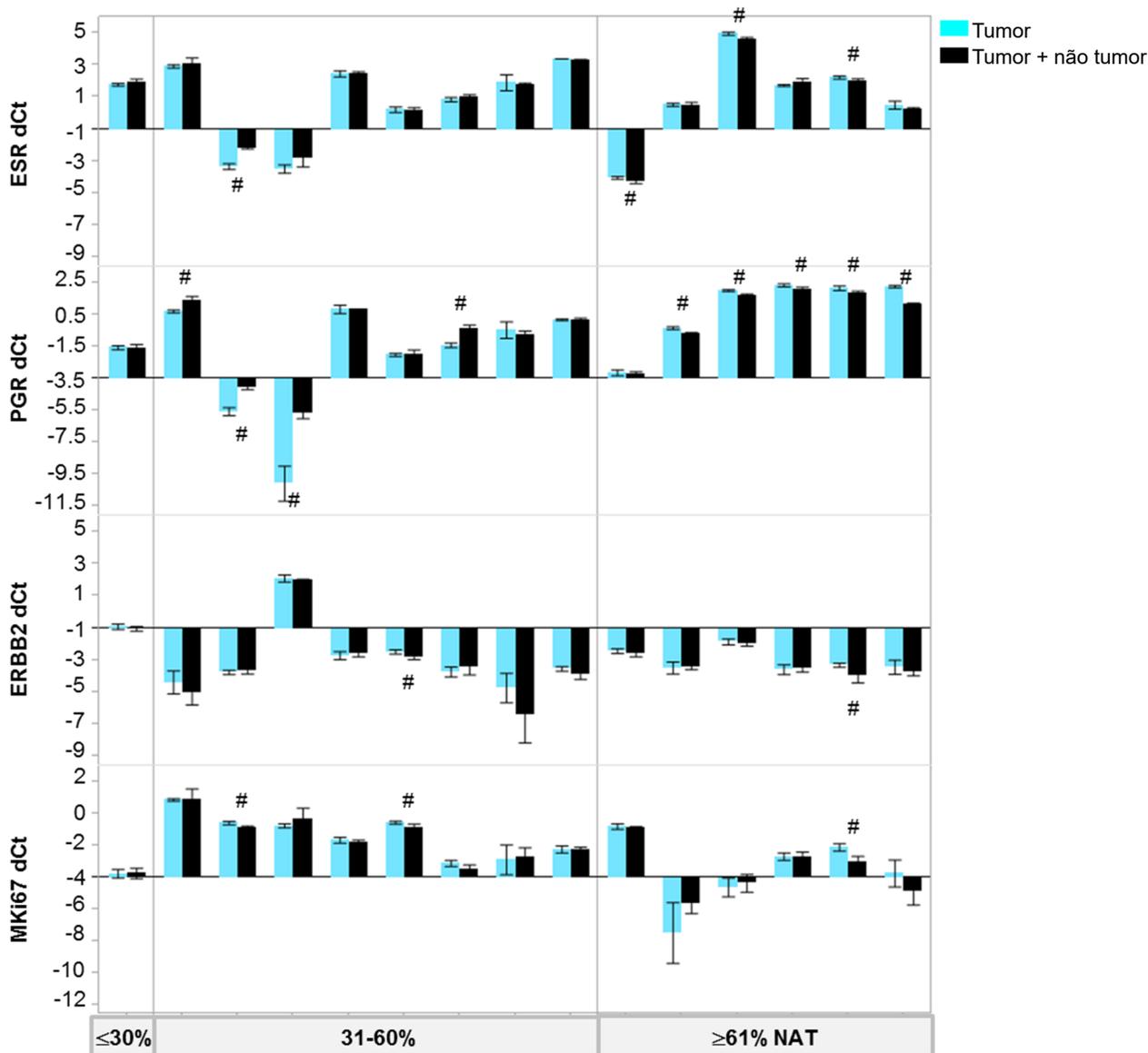
19.2 Teste de interferências

Tecido normal/não tumoral adjacente

Os tecidos normais (não tumorais) adjacentes (NAT) estão frequentemente presentes em amostras de tecido de cancro mamário como contaminantes que poderão interferir com a deteção do alvo específico. Poderá ser necessário para o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 que um corte de FFPE do tumor mamário comprovado patologicamente seja sujeito a macrodissecção para minimizar os potenciais efeitos de contaminantes não tumorais em casos aplicáveis, conforme determinado por um patologista. Para avaliar o efeito de tecidos normais/não tumorais adjacentes, foram testados com o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 quinze (15) blocos de tecido FFPE com carcinoma da mama invasivo contendo 21%-98% no tecido adjacente normal (NAT), com e sem macrodissecção. O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 foi realizado com N = 4 réplicas do mesmo lisado por condição. Os dCt de ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 para cada amostra de tecido com macrodissecção (gráfico de barras a azul) ou sem macrodissecção (gráfico de barras a preto) foram primeiro avaliados através da análise One-Way ANOVA para determinar a interferência estatística do NAT. Uma interferência por NAT foi considerada como clinicamente significativa quando a ddCt (Ct variação-variação) entre as amostras sujeitas a macrodissecção e as não sujeitas foi de $>1,0$ e se observou uma alteração no resultado de teste. Os resultados do estudo são resumidos na Figura 6.

Os dCt de ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 para todas as 15 amostras foram agrupados com base na % no NAT ($\leq 30\%$, $31\%-60\%$ ou $\geq 61\%$). Os gráficos de barras verticais azul e preto com DP representam os dCt alvo médios de $N = 4$ réplicas de cortes de FFPE sujeitos a macrodissecção e não sujeitos a partir de um bloco de cancro da mama invasivo FFPE. Todos os 15 blocos FFPE ($N = 1$ abaixo de 30% no NAT, $N = 8$ com $31\%-60\%$ no NAT e $N = 6$ acima de 60% no NAT) não demonstraram significado estatístico em relação a interferência de tecido normal/não tumoral adjacente com base em análises One-Way ANOVA com valor $p \geq 0,05$ ou não demonstraram significado clínico (marcado como #) se a variação nos valores de Ct de variação de cada alvo entre amostras sujeitas e não sujeitas a macrodissecção foi $\leq 1,0$ ou quando os resultados de teste-alvo (positivo, negativo) não foram afetados.

Figura 6. Interferência de tecido normal/não tumoral adjacente com dCt-alvo do ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4



Tecido de DCIS, necrótico ou hemorrágico

Para avaliar o efeito de carcinoma ductal in situ (DCIS), de tecidos necróticos e hemorrágicos, foram testadas com o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 9 amostras de tumor mamário FFPE (3 blocos de tumor mamário FFPE contendo 3%-61% de DCIS, 3 blocos FFPE contendo 10%-65% de tecido necrótico e 3 blocos FFPE contendo 15%-41% de tecido hemorrágico), com e sem macrodissecação. O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 foi realizado com N = 4 réplicas do mesmo lisado por condição. Verificou-se que todas as condições de teste não tinham impacto estatístico ou clínico significativo proveniente de contaminações variáveis com DCIS, tecido necrótico e hemorrágico utilizando o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 (dados gráficos não mostrados).

ADN genômico humano (hgDNA)

O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 utiliza iniciadores e sondas altamente específicos para uma hibridação eficiente com os modelos de ARNm do ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 provenientes de um pool de ácidos nucleicos genômicos (ADN genômico humano = hgDNA). Para avaliar o efeito de hgDNA no teste Xpert Breast Cancer STRAT4, 10 blocos de tumor mamário FFPE com diversos graus de conteúdo celular de carcinoma ductal invasivo foram macrodissecados e testados

com e sem a adição de 25 ng de hgDNA aos lisados de amostras FFPE, utilizando o teste Xpert Breast Cancer STRAT4 em N = 4 réplicas do mesmo lisado por condição. Verificou-se que todas as condições de teste não tinham impacto estatístico ou clínico significativo proveniente de interferência do hgDNA (dados gráficos não mostrados).

19.3 Contaminação por transferência

Foi realizado um estudo para demonstrar que os cartuchos GeneXpert autônomos, de utilização única, minimizam a contaminação por transferência de amostras muito positivas para amostras negativas subsequentemente executadas no mesmo módulo GeneXpert. O estudo consistiu numa amostra negativa processada no mesmo módulo GeneXpert imediatamente após uma amostra muito positiva para ESR1/PGR/ERBB2/MKi67. A amostra negativa consistiu em ARN de transcrito *in vitro* (IVT) contendo 5×10^4 cópias de transcrito do CYFIP1 para garantir a presença de um alvo de gene de referência. A amostra muito positiva consistiu em ARN de IVT contendo 5×10^5 cópias de transcrito do CYFIP1 e ARN de IVT contendo 5×10^6 cópias de transcritos de ESR1, PGR, ERBB2 e MKi67 preparados como lisado de FFPE. O esquema de testes foi repetido 41 vezes utilizando um único módulo GeneXpert, correspondendo a um total de 20 amostras muito positivas e 21 negativas. Todas as 20 amostras muito positivas foram corretamente apresentadas como ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 POSITIVAS (POSITIVE) e todas as 21 amostras negativas foram corretamente apresentadas como ESR1/PGR/ERBB2/MKi67 NEGATIVAS (NEGATIVE).

19.4 Reprodutibilidade e precisão do ensaio

A reprodutibilidade do ensaio Xpert Breast Cancer STRAT4 foi avaliada utilizando um painel de cinco amostras de lisado.

Três membros do painel foram preparados através da adição de materiais de ARN de transcrito *in vitro* (IVT) a tampão de lise de FFPE contaminado dentro do intervalo de ~2 dCt dos cut-off do dCt para o ESR1 (ARN de IVT 1), o PGR (ARN de IVT 2) e o ERBB2 (ARN de IVT 3) e com valores de Ct de CYFIP1 ~2-3 Ct em relação ao nível do volume mínimo para o ensaio.

Dois membros do painel (amostra FFPE 4 clínica e amostra FFPE 5 clínica) foram criados a partir de amostras FFPE clínicas agrupadas em tampão de lise FFPE para gerar valores de Ct do CYFIP1 próximos do volume mínimo para o ensaio e com valores de cut-off do dCt para todos os alvos em todo o intervalo reportável e até à extensão possível próximo dos cut-off do dCt.

Dois operadores em cada um dos três centros de estudo testaram dois painéis de cinco amostras por dia durante seis dias de testes (cinco amostras x seis dias x dois operadores x duas réplicas x três centros). Foi testado um total de 72 réplicas por amostra. Foram utilizados três lotes de cartuchos do Xpert Breast cancer STRAT4 em cada um dos três centros de teste. O teste Xpert Breast Cancer STRAT4 foi realizado de acordo com o procedimento descrito nestas instruções de utilização.

A reprodutibilidade do Xpert Breast Cancer STRAT4 foi avaliada em termos do dCt para cada um dos quatro alvos para cada painel. A média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) entre centros, entre lotes, entre dias, entre operadores e intra-ensaio para cada membro do painel são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resumo dos dados de reprodutibilidade

Amostra	Canal de ensaio (analito)	N ^a	dCt médio	Entre centros		Entre lotes		Entre dias		Entre operadores		Intra-ensaio		Total	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
ARN do IVT-1	ESR1	72	0,20	0,00	0,00	0,03	29,30	0,00	0,00	0,00	1,80	0,07	68,90	0,11	0,33
	PGR	72	-0,03	0,00	0,00	0,01	14,70	0,00	2,30	0,00	0,00	0,06	83,00	0,07	0,26
	ERBB2	72	-2,42	0,00	0,00	0,04	27,90	0,02	11,40	0,00	2,60	0,08	58,10	0,13	0,36
	MKi67	70	-2,55	0,00	0,00	0,32	62,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	37,90	0,52	0,72
ARN do IVT-2	ESR1	72	-1,03	0,00	1,60	0,01	9,20	0,01	5,50	0,00	0,00	0,10	83,70	0,12	0,35
	PGR	72	-1,26	0,00	0,00	0,01	12,20	0,00	0,00	0,01	10,70	0,04	77,10	0,05	0,23
	ERBB2	72	-3,49	0,01	4,80	0,03	31,60	0,00	0,00	0,00	0,40	0,07	63,20	0,11	0,33
	MKi67	72	-3,53	0,00	0,00	0,08	49,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	51,00	0,16	0,40
ARN do IVT-3	ESR1	72	3,64	0,00	0,00	0,01	8,40	0,01	16,50	0,00	0,00	0,06	75,10	0,08	0,29
	PGR	72	3,34	0,00	3,40	0,00	0,00	0,01	9,70	0,00	5,40	0,05	81,50	0,06	0,25
	ERBB2	72	0,91	0,02	20,60	0,01	10,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	69,10	0,08	0,28

Amostra	Canal de ensaio (analito)	N ^a	dCt médio	Entre centros		Entre lotes		Entre dias		Entre operadores		Intra-ensaio		Total	
				Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)	Var	CV (%)
	MKi67	72	1,14	0,00	0,00	0,02	15,40	0,02	18,00	0,00	0,00	0,07	66,60	0,10	0,31
Amostra clínica de FFPE-4	ESR1	72	-0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,40	0,00	15,90	0,02	69,70	0,03	0,17
	PGR	72	-1,99	0,00	6,30	0,01	19,70	0,00	2,50	0,00	0,00	0,02	71,60	0,03	0,18
	ERBB2	72	-2,39	0,02	31,30	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00	3,70	0,05	62,80	0,07	0,27
	MKi67	72	-0,93	0,00	0,00	0,02	36,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	63,50	0,04	0,21
Amostra clínica de FFPE-5	ESR1	72	-2,83	0,00	0,00	0,05	13,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	86,30	0,39	0,63
	PGR	72	-5,66	0,00	0,00	0,02	3,60	0,03	4,40	0,00	0,00	0,56	92,00	0,60	0,78
	ERBB2	72	1,93	0,00	2,90	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	94,20	0,03	0,17
	MKi67	72	-1,57	0,00	1,70	0,01	17,10	0,01	9,00	0,00	11,10	0,05	61,10	0,09	0,29

^a Resultados com valores de Ct de variação válidos em 72

20 Referências

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015.
2. Centro Internacional de Investigación do Cancro (CIIC) e Organização Mundial da Saúde (OMS). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
3. American Cancer Society, Breast Cancer Facts and Figures 2013-2014, Atlanta, GA: American Cancer Society, 2013.
4. Rose C, Thorpe SM, Lober J, Deenfeldt J, Palshof T, Mouridsen HT. Therapeutic effect of tamoxifen related to estrogen receptor level. *Recent Results Cancer Res* 1980; 71:134-41.
5. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuchler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg* 1993; 218:13-21.
6. Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1991;9:1283-1297.
7. Fisher KB, Redmond KC, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, Escher G, Lippman M, Savlov E, Wittliff J. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1:227-241.
8. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression; comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105.
9. Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84:219-225.
10. Fasching PA, Heusinger K, Haerberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C, Schulz-Wendtland R, Bani MR, Schrauder M, Kahmann L, Lux MP, Strehl JD, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Wachter DL. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 Nov 14; 11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
11. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008 Aug;17(4):323-34.
12. de Matos LL, Truffelli 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
13. Roepman P, Horlings HM, Krijgsman O, Kok M, Bueno-de-Mesquita JM, Bender R, Linn SC, Glas AM, van de Vijver MJ. Microarray-Based Determination of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Status in Breast Cancer *Clin Cancer Res* 2009; 15(22) 7003-11.
14. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Bayde S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Magnu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134:907-922.

15. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013; 31(31): 3997-4013.
16. REGULAMENTO (CE) N.º 1272/2008 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, de 16 de Dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga a lista de recomendações de prudência, as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006.
17. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
18. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 (134).
19. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 (138), 241-256.

21 Locais das sedes da Cepheid

Sede empresarial

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Sede europeia

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

22 Assistência técnica

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 do software e, caso se aplique, número da etiqueta de serviço do computador

Estados Unidos da América

Telefone: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

França

Telefone: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

As informações de contacto de todos os escritórios da assistência técnica da Cepheid estão disponíveis no nosso website:
www.cepheid.com/en/support/contact-us

Termos e Condições da Cepheid podem ser encontrados em www.cepheid.com/en/support/support/order-management.

23 Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marcação CE — Conformidade Europeia
	Mandatário na Comunidade Europeia
	Não reutilizar
	Código de lote
	Consultar as instruções de utilização
	Cuidado
	Fabricante
	País de fabrico
	Conteúdo suficiente para n testes
	Controlo
	Prazo de validade
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos
	Mandatário na Suíça
	Importador



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France



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



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



24 Histórico de revisões

Secção	Descrição da alteração
Tabela de símbolos	Adição do símbolo do CH REP e do importador, bem como definições na tabela de símbolos. Adição da informação do CH REP e do importador, incluindo o endereço na Suíça.
Histórico de revisões	Atualização da tabela relativa ao histórico de revisões.