

Formación técnica para el ensayo Xpert® HBV Viral Load

Para uso de CE-IVD exclusivamente

Centro de formación de Cepheid



Programa de formación

- **Xpert® HBV Viral Load**
 - Utilidad clínica
 - Reactivos
 - Recogida de muestras
 - Conservación y manipulación del kit
 - Preparación del cartucho
 - Controles de calidad
 - Análisis de resultados
- **Discusión**



Objetivos del curso

- **Al final del curso de formación, el usuario será capaz de:**
 - Conservar y manipular debidamente el kit del cartucho y los kits de recogida de muestras del Xpert® HBV Viral Load.
 - Tomar las precauciones de seguridad de laboratorio adecuadas.
 - Recoger tipos de muestras apropiados y transportar las muestras.
 - Preparar el cartucho y realizar la prueba Xpert® HBV Viral Load.
 - Comprender la estrategia de control del ensayo.
 - Notificar los diversos resultados generados por el software.

La solución Cepheid



- Detecta y cuantifica la diana del VHB
 - Resultados fiables con un intervalo lineal de 10 – 1 000 000 000 UI/ml
- Controles incorporados para cada muestra individual
 - Adecuación del volumen de la muestra (SVA)
 - Control de comprobación de la sonda (PCC)
 - Patrones cuantitativos internos (IQS) alto (H) y bajo (L)
- Resultados en aproximadamente 60 minutos
- Sistema de cartucho cerrado que minimiza el riesgo de contaminación
- Resultados a petición, 24 horas al día y 7 días a la semana
- Acceso aleatorio

Indicaciones

- El ensayo Xpert® HBV Viral Load es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la **cuantificación rápida del ADN del virus de la hepatitis B (VHB)** en suero o plasma (con EDTA) humano de personas con infección crónica por VHB, utilizando los sistemas GeneXpert® automatizados.
- El ensayo Xpert® HBV Viral Load está validado para la cuantificación de ADN del VHB de los **genotipos A, B, C, D, E, F, G, H**
- El ensayo está concebido para utilizarse junto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio como un indicador del **pronóstico de la enfermedad**, y como ayuda en la valoración de la respuesta vírica al tratamiento antirretroviral, que se mide por los cambios en los niveles séricos o plasmáticos del ADN del VHB.
- La prueba no está indicada para utilizarse como prueba de cribado de donantes de sangre para la infección por VHB, ni como prueba de diagnóstico para confirmar la presencia de infección por VHB.

Dianas y sondas

- **Diana**
 - ADN del VHB

- **Sondas**
 - 1 sonda para el patrón interno de cuantificación - Alta
 - 1 sonda para el patrón interno de cuantificación - Baja
 - 1 sonda para VHB

Requisitos de Xpert® HBV Viral Load

Sistemas GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **v4.7b** o posterior/software Infinity Dx **v6.4 b** o posterior

Kits de la prueba (CE-IVD)

- GXHBV-VL-CE-10

Recogida de muestras

- Tubos K2-EDTA/PPT-EDTA o de recogida de suero

Otros materiales

- Equipo de protección individual (EPI)
- Lejía a 1:10
- Etanol desnaturalizado o etanol al 70 %
- Centrífuga para la preparación de plasma/suero

Opcional

- Sistema de alimentación ininterrumpida/Protector de sobretensiones
- Impresora

Buenas prácticas de laboratorio

Equipo de protección individual (EPI)

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

Área de la mesa del laboratorio

- Limpie las superficies de trabajo de forma habitual con:
 - ✓ Dilución 1:10 de lejía de uso doméstico
 - ✓ Solución de etanol al 70 %
- Después de la limpieza, asegúrese de que las superficies de trabajo estén secas

Conservación de muestras y kits

- Conserve las muestras separadas del kit para prevenir la contaminación

Equipo

- Utilice puntas con filtro cuando se recomiende
- Siga los requisitos del fabricante para la calibración y el mantenimiento del equipo

Manipulación del kit



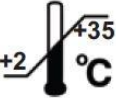
Contenido del kit Xpert® HBV Viral Load

Número de catálogo	GXHBV-VL-CE-10
Pruebas por kit	10
CD del kit	Archivo de definición del ensayo (Assay Definition File, ADF)
	Instrucciones para la importación de ensayos
	Prospecto (PDF)
Pipetas de transferencia	10 (1 ml)
Conservación	2-35 °C



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

Advertencias y precauciones

- Conserve los cartuchos y reactivos del ensayo Xpert® HBV Viral Load a 2–35 °C 
- Siga los procedimientos de seguridad del centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas
- No utilice tubos de reactivos de recogida que no haya validado Cepheid
- Abra la tapa del cartucho del ensayo solo para añadir la muestra, cierre la tapa y continúe con el procesamiento
- No sustituya los reactivos del ensayo Xpert® HBV Viral Load por otros reactivos

Advertencias y precauciones

- No agite el cartucho.
- No utilice un cartucho que...
 - parezca mojado, tenga alguna fuga o en el que el precinto de la tapa parezca haberse roto.
 - parezca dañado.
 - se haya caído después de extraerlo del envase.
 - se haya caído o agitado después de habersele añadido la muestra.
 - tenga un tubo de reacción dañado.
 - se haya utilizado: cada cartucho de un solo uso se utiliza para procesar una sola prueba.
 - haya caducado.
- No vuelva a utilizar pipetas desechables usadas.



Deseche los cartuchos y reactivos del ensayo Xpert® HBV Viral Load siguiendo las pautas del centro y del país para la eliminación de materiales peligrosos

Advertencias y precauciones

- Las muestras biológicas, los dispositivos de transferencia y los cartuchos usados deben ser considerados capaces de transmitir agentes infecciosos, y 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 presentar 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 usados deben desecharse de conformidad con las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) relativas a la manipulación y eliminación de desechos médicos.

Limitaciones del ensayo Xpert[®] HBV Viral Load

- No se ha demostrado la eficacia diagnóstica de Xpert[®] HBV Viral Load con muestras diferentes a aquellas con las que se ha validado (muestras de **suero y plasma**)
- La eficacia diagnóstica de la prueba Xpert[®] HBV Viral Load no se ha evaluado con muestras procesadas mediante métodos diferentes a los descritos en el prospecto
- Si no se siguen los procedimientos del ensayo, pueden obtenerse resultados negativos falsos
- Los inhibidores presentes en las muestras pueden hacer que se obtengan resultados no válidos.

Para obtener información detallada, consulte el prospecto actual.

Recogida, conservación y transporte de muestras



Recogida de muestras




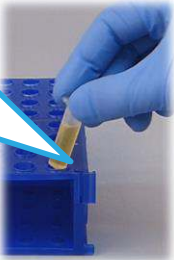



- La sangre completa debe recogerse en tubos K2-EDTA, PPT-EDTA o de recogida de suero, y centrifugarse para separar el plasma/suero de los hematíes según las instrucciones del fabricante.

¡No use un tubo con heparina!



- Si está utilizando la **pipeta de transferencia** incluida en el kit, llénela hasta la 4^a marca (1 ml) con plasma o suero
- Si está utilizando una **pipeta de precisión**, transfiera 600 μ l de plasma o suero

Conservación y transporte de muestras

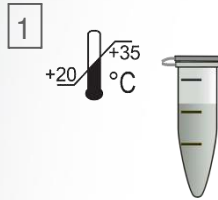
	Antes de realizar pruebas	Temperatura (°C)	Tiempo de conservación
	Sangre completa anticoagulada con EDTA		24 horas
			72 horas
	Plasma/suero		24 horas
			7 días
			6 semanas

Las muestras de plasma/suero son estables durante tres ciclos de congelación y descongelación como máximo.

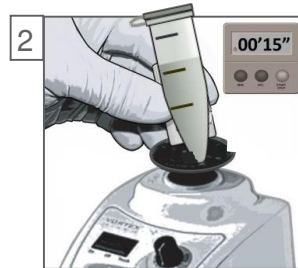
Preparación del cartucho



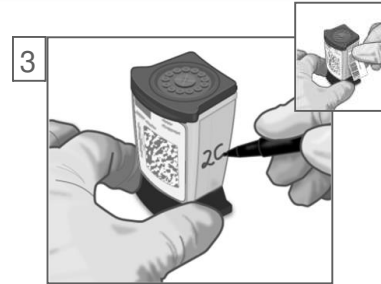
Preparación del cartucho – Suero o plasma



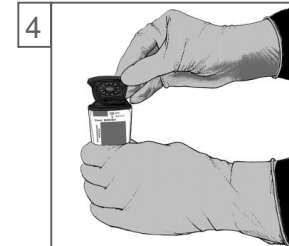
Si utiliza muestras congeladas o refrigeradas, déjelas a temperatura ambiente hasta que se descongelen completamente y se equilibren con la temperatura ambiente.



Agite la muestra equilibrada con un mezclador vórtex durante 15 segundos. Si la muestra está turbia, centrifúguela durante unos segundos.



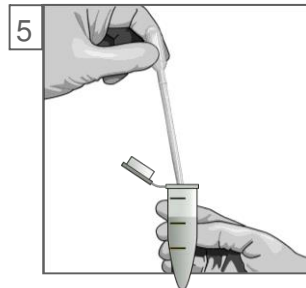
Etiquete el lateral del cartucho con el ID de la muestra.



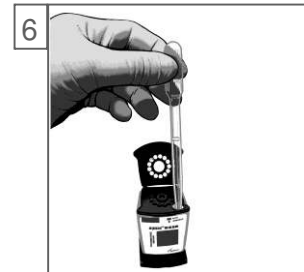
Abra la tapa del cartucho.



*Pipeta de transferencia del ensayo HBV VL



Pipete un mínimo de 1 ml de la muestra utilizando la pipeta suministrada.*



Vacíe lentamente la pipeta en la cámara de muestras del cartucho.



Cierre firmemente la tapa.

Inicie la prueba en el sistema GeneXpert antes de que transcurran 4 horas.

Realice una prueba

1 Cree una prueba

GeneXpert



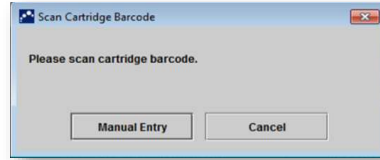
Comience la prueba en las **4 horas** siguientes a añadir la muestra al cartucho

GeneXpert
Infinity



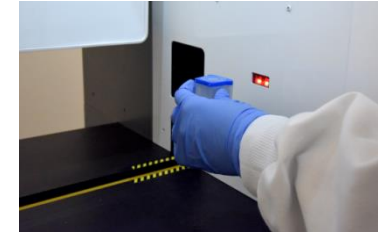
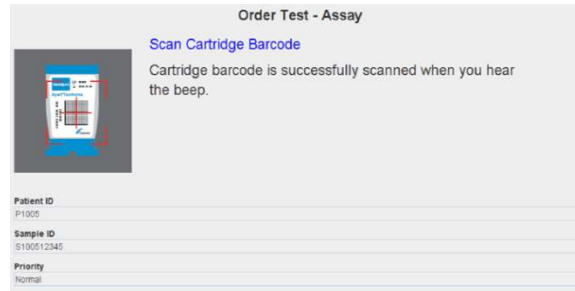
Coloque el cartucho en la cinta transportadora en los **30 minutos** siguientes a la adición de la muestra.

2 Escanee los mensajes del código de barras: ID del cartucho/paciente y/o muestra



De forma predeterminada, no haga clic en **Entrada manual (Manual Entry)** ni en **Cancelar (Cancel)**

3 Escanee el cartucho



"Para obtener los detalles completos sobre cómo realizar una prueba, consulte el prospecto y los manuales del operador de GeneXpert Dx o Xpertise.

Cree una prueba en el software GeneXpert Dx

4 Complete los campos según sea necesario

5 El protocolo del ensayo se selecciona automáticamente

6 El módulo se selecciona automáticamente
¡NO LO CAMBIE!

7 Haga clic en Iniciar prueba (Start Test)

8 Parpadeará una luz verde en el módulo
Cargue el cartucho en el módulo y cierre la puerta

Create Test

Patient ID
Sample ID
Patient ID 2
Last Name

Name
Select Assay: Xpert HBV Viral Load
Select Module: A3
Reagent Lot ID*: 16119 Expiration Date*: 2016/1/17
Test Type: Specimen
Sample Type: Other
Notes

Start Test Scan Cartridge Barcode

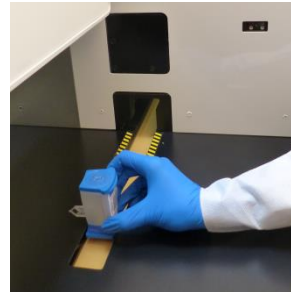


Cree una prueba en el software Xpertise Dx

- 4 Complete los campos según sea necesario
- 5 El protocolo del ensayo se selecciona automáticamente
- 6 Haga clic en ENVIAR (SUBMIT)
- 7 Coloque el cartucho en la cinta transportadora

Order Test - Test Information

Patient ID patientid	
Sample ID sampleid	
Last Name patient	First Name id
Assay* Xpert HBV Viral Load	
Reagent Lot ID* 12102	Cartridge S/N* 282769448
Expiration Date* 2018/11/04	Priority Normal
Test Type Specimen	
Sample Type Other	Other Sample Type
Notes	



Protocolo automatizado del Xpert



Controles de calidad



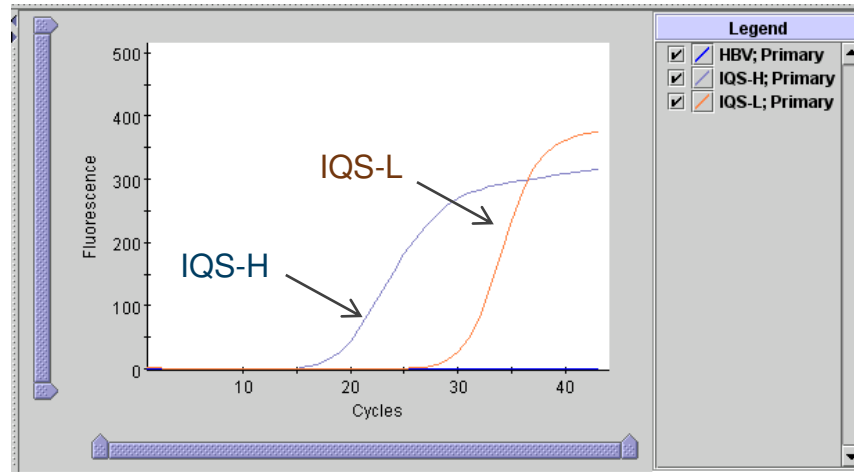
- «**Controles de calidad**» del ensayo Xpert® HBV Viral Load
 - Cada cartucho Xpert es un dispositivo analítico autónomo
 - Cepheid ha diseñado métodos moleculares específicos para incluir controles internos que permiten al sistema detectar fallos específicos dentro de cada cartucho
 - Adecuación del volumen de la muestra (SVA)
 - Control de comprobación de la sonda (PCC)
 - Patrones cuantitativos internos (IQS)

Controles de calidad internos

- **Adecuación del volumen de la muestra (SVA)**
 - Verifica que se haya añadido el volumen correcto de muestra al cartucho.
- **Controles de comprobación de la sonda (PCC)**
 - Antes del paso de la PCR, se mide la señal de fluorescencia en todas las sondas y se compara con los ajustes predeterminados para comprobar lo siguiente:
 - rehidratación de las microesferas
 - integridad de las sondas
 - llenado del tubo de reacción
 - estabilidad del colorante
- **Patrón cuantitativo interno alto y bajo (IQS-H y IQS-L)**
 - Dos plásmidos linealizados con una secuencia no relacionada con el VHB, en forma de una microesfera seca
 - Se utiliza para calcular la concentración de ADN del VHB en la muestra
 - Detecta la inhibición asociada a la muestra del ensayo de PCR en tiempo real y actúa como control de procesamiento de muestras
 - Los valores de Ct y de fluorescencia del IQS Low (bajo) y del IQS High (alto) deben estar siempre dentro del rango válido

Patrones de cuantificación internos (IQS)

- IQS-H tiene un valor de Ct mas bajo que IQS-L
 - IQS-H Patrón de cuantificación interno alto
 - IQS-L Patrón de cuantificación interno bajo



Controles externos comerciales disponibles

Thermofisher - <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product>

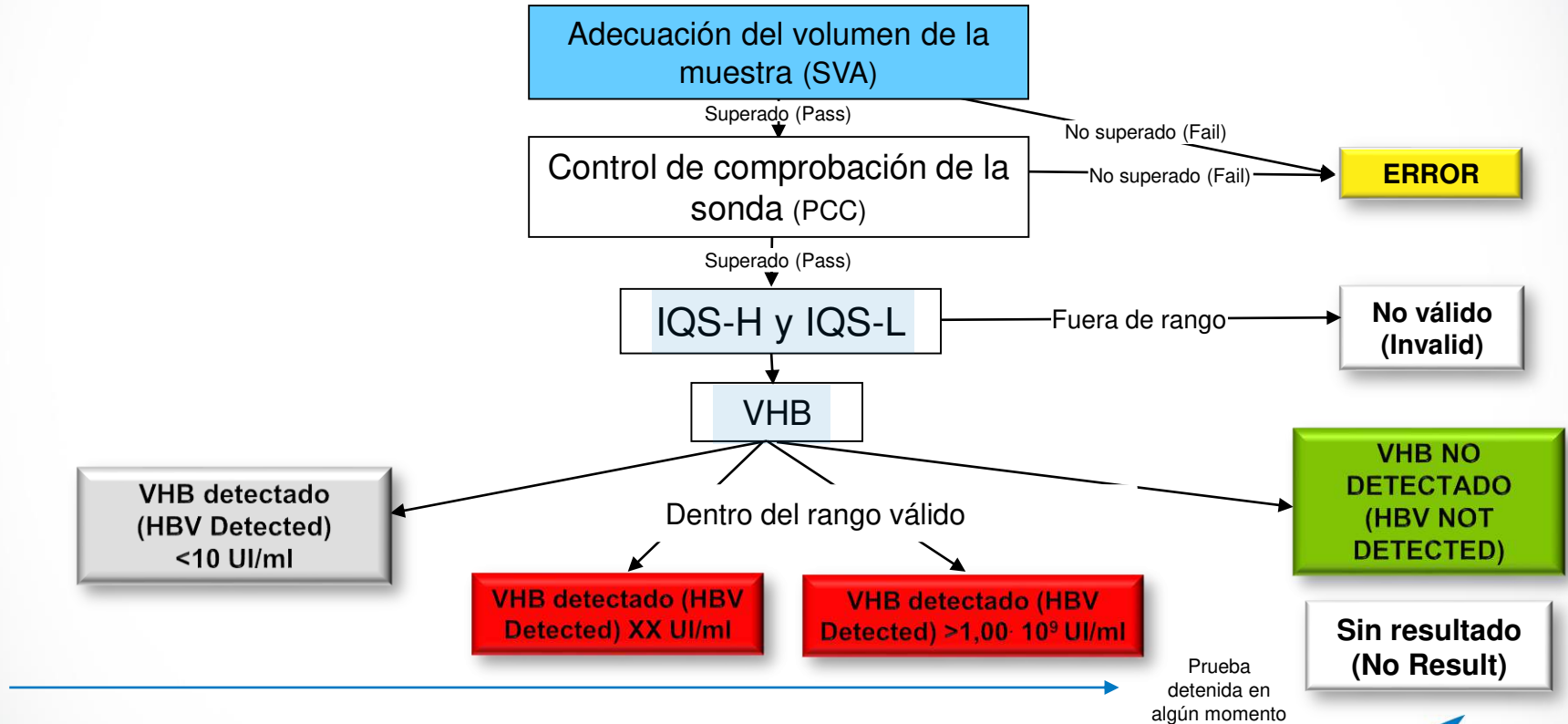
Número de referencia	Descripción	Configuración	Conservación
965003	Control alto de VHB AcroMetrix	5 frascos de 1 ml	≤ -20 °C
965002	Control intermedio de VHB AcroMetrix	5 frascos de 1 ml	≤ -20 °C
965001	Control bajo de VHB AcroMetrix	5 frascos de 1 ml	≤ -20 °C

- Muchos otros proveedores de material de control de calidad también están disponibles además del descrito anteriormente.
- Los controles externos deben utilizarse de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales y estatales, según corresponda.

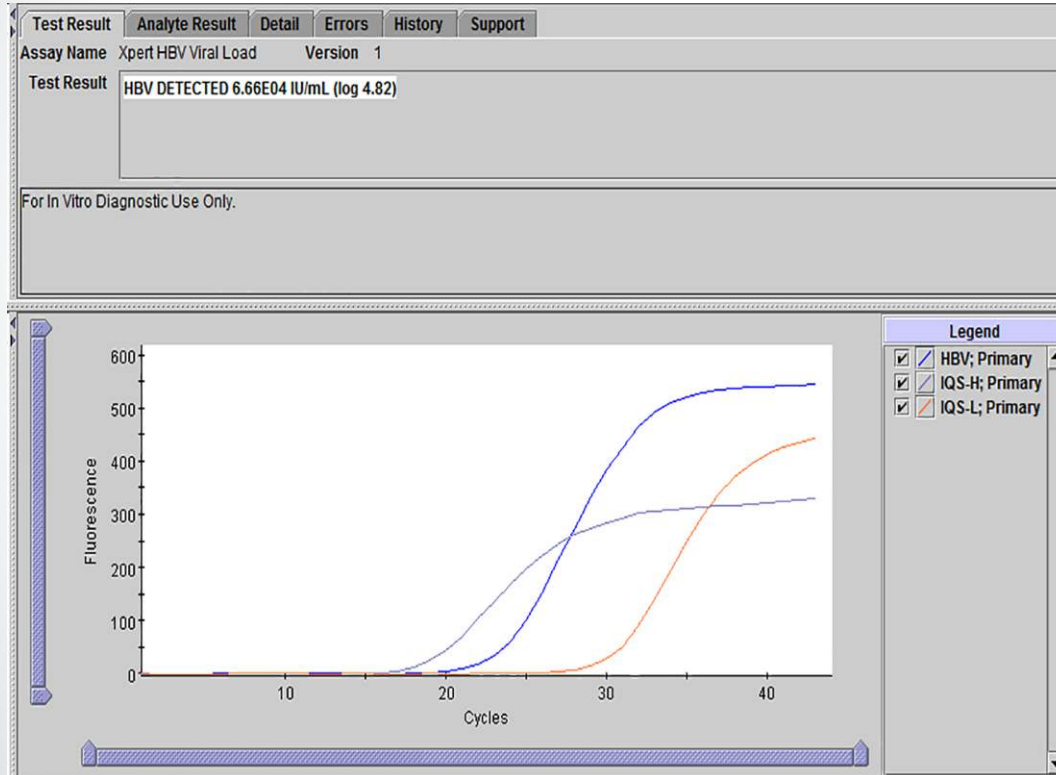
Interpretación de los resultados



Algoritmo de interpretación de los resultados



VHB DETECTADO (HBV DETECTED) 6,66E04 UI/ml

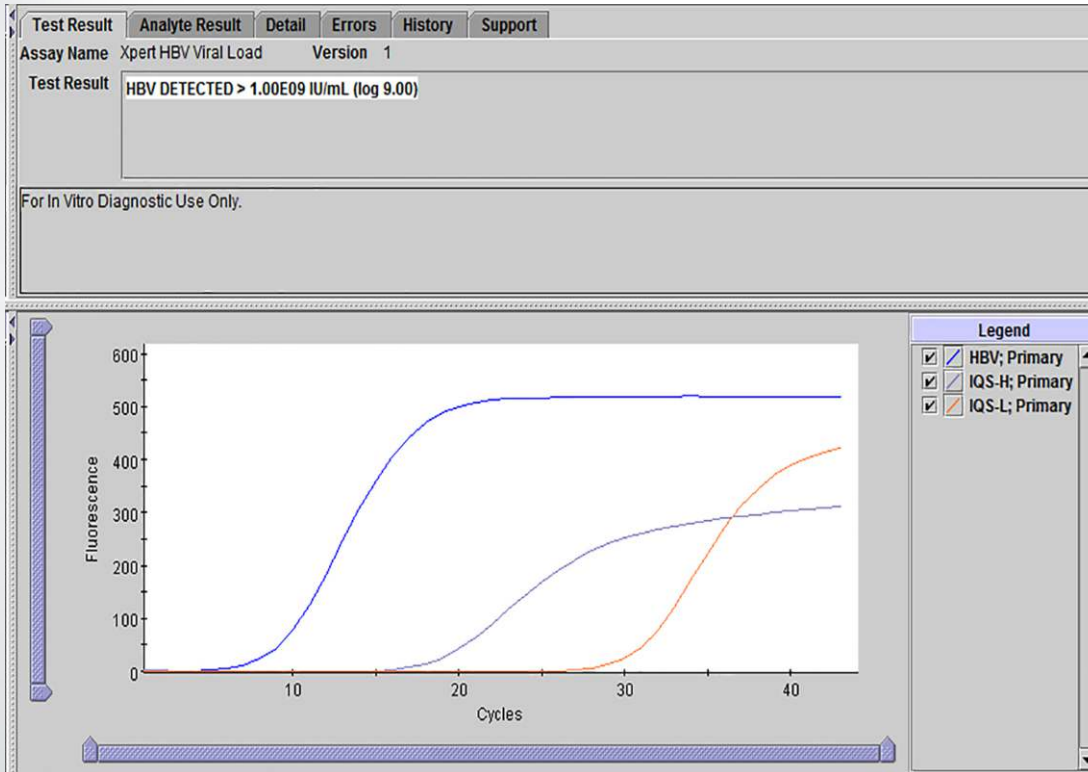


- Se ha detectado un valor cuantitativo de ADN del VHB
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

Cálculo de ejemplo:

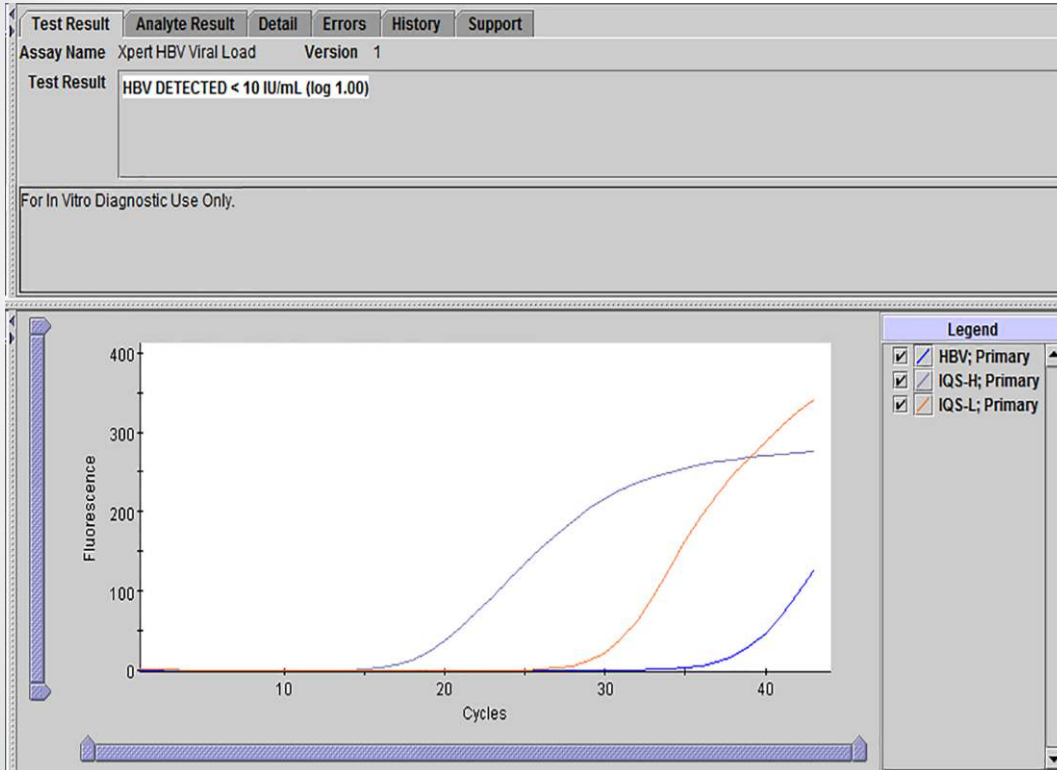
$$6,66E04 = 6,66 \times 10^4 = 66600 \text{ UI/ml}$$

VHB DETECTADO (HBV DETECTED) >1,00E09 UI/ml



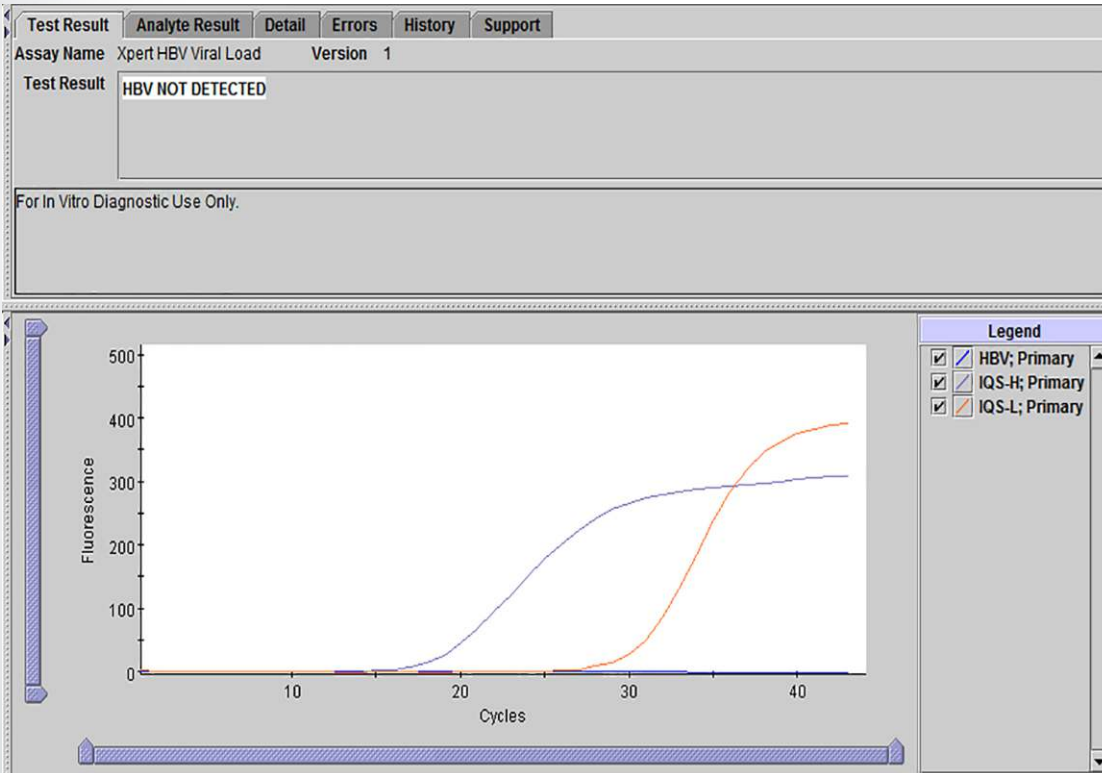
- Se ha detectado ADN del VHB por encima del intervalo cuantitativo del ensayo
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

VHB DETECTADO (HBV DETECTED) <10 UI/ml



- Se ha detectado ADN del VHB por debajo del intervalo cuantitativo del ensayo
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

VHB NO DETECTADO (HBV NOT DETECTED)



- NO se ha detectado ADN del VHB
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

Resolución de problemas

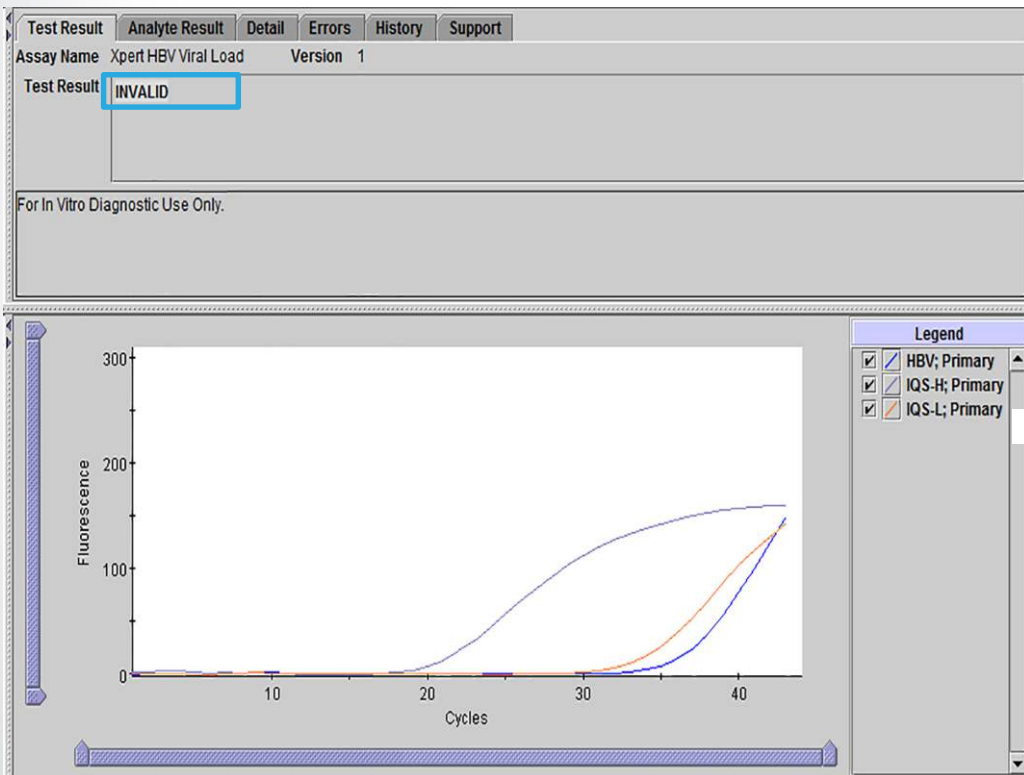


Factores que afectan negativamente a los resultados

- **Recogida inadecuada de muestras**
 - No se ha determinado el rendimiento logrado con otros dispositivos de recogida y con otros tipos de muestra.
- **Transporte o conservación inadecuados de la muestra recogida**
 - Consulte las instrucciones del prospecto para la manipulación adecuada.
- **Procedimiento inadecuado de realización de la prueba**
 - La modificación de los procedimientos de análisis, los errores técnicos y la mezcla de muestras pueden afectar a los resultados de la prueba.
 - Para evitar resultados erróneos es necesario seguir estrictamente las instrucciones del prospecto.
- **Sustancia interferente**
 - Si hay presente alguna sustancia interferente, pueden observarse resultados negativos falsos o no válidos.

Resultado NO VÁLIDO (INVALID)

INVALID



No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN del VHB

- IQS-H y/o IQS-L: NO SUPERADO (FAIL)

Los umbrales de ciclo (Ct) de los controles cuantitativos internos no están dentro del intervalo válido.

- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

- Causas posibles (consulte el manual del operador para obtener información más detallada):

- Recogida inadecuada de la muestra (utilizando un tubo con heparina)
- Preparación incorrecta de la muestra
- Conservación inadecuada de los cartuchos
- Procesamiento ineficaz de la muestra en el cartucho
- Presencia de inhibidores en la muestra
- Llenado insuficiente del tubo o burbuja en el tubo de la PCR

- Solución

- Repita la prueba con un cartucho y una muestra nuevos.

Interferencia con el ensayo

- Sustancias potencialmente interferentes (consulte el prospecto para obtener más detalles)
 - Se evaluaron un total de 5 sustancias endógenas
 - Se demostró que las altas concentraciones de esas sustancias endógenas **no afectaron** a la especificidad de ensayo ni interfirieron en la detección del VHB

Sustancia	Concentración analizada
Albúmina	9 g/dl
Bilirrubina	20 mg/dl
Hemoglobina	500 mg/dl
ADN humano	0,4 mg/dl
Triglicéridos	3000 mg/dl

- Se ha observado que los componentes farmacológicos siguientes **no interfieren en la cuantificación** ni en la especificidad del ensayo Xpert HBV Viral Load

Grupo	Fármacos
1	Zidovudina, saquinavir, claritromicina, interferón-alfa-2b, ritonavir, ombitasvir, paritaprevir, dasabuvir, didanosina
2	Sulfato de abacavir, fosamprenavir, peginterferón-alfa-2a, ribavirin, entecavir, adefovir dipivoxil
3	Fumarato de tenofovir disoproxilo, lamivudina, sulfato de indinavir, ganciclovir, clorhidrato de valganciclovir, aciclovir, paroxetina, telbivudina
4	Estavudina, efavirenz, lopinavir, enfuvirtida, ciprofloxacino, fluoxetina
5	Nevirapina, nelfinavir, azitromicina, valaciclovir, sertralina, tenofovir alafenamida

Resultado ERROR

ERROR

Test Result	Analyte Result	Detail	Errors	History	Support
Troubleshoot					
#	Description	Detail			
1	Operation terminated	Error 2097: Assay-Specific Termination Error #2: 46, 29, 1, 0			

La comprobación de la adecuación del volumen de la muestra (SVA) no cumplió los criterios de aceptación validados.

Código del error	Causa	Solución
2096	No se añadió muestra	<ul style="list-style-type: none">– Asegúrese de que la muestra se haya añadido al cartucho.– Asegúrese de que el cartucho se carga en las 4 horas siguientes a la adición de la muestra.
2097	No se añadió suficiente muestra	<ul style="list-style-type: none">– Asegúrese de que se añadió el volumen de muestra mínimo al cartucho.– Asegúrese de que el cartucho se carga en las 4 horas siguientes a la adición de la muestra.

Procedimiento de repetición de la prueba

1

Deseche el cartucho usado

Siga las directrices de seguridad del centro para la eliminación de los cartuchos

2



Obtenga la muestra residual, mezcle conforme al prospecto

Si el volumen de muestra restante es insuficiente o si la repetición de la prueba sigue indicando NO VÁLIDO (INVALID), ERROR o SIN RESULTADO (NO RESULT), obtenga una muestra nueva

3



Obtenga un nuevo cartucho

Etiquete adecuadamente como nueva prueba en el nuevo cartucho

Procese la muestra conforme al prospecto

4



Ejecute la prueba en el sistema GeneXpert



Asistencia técnica

- 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 sistema
 - Mensajes de error (si los hubiera)
 - Versión de software y, si corresponde, «Service Tag» (número de servicio técnico) del ordenador.
- Presente su reclamación utilizando el siguiente enlace <http://www.cepheid.com/us/support>: **Crear caso de servicio técnico (Create a Support Case)**

Región	Teléfono	Correo electrónico del servicio técnico
EE. UU.	+ 1 888 838 3222	techsupport@cepheid.com
Australia y Nueva Zelanda	+ 1800 107 884 (AU) + 0800 001 028 (NZ)	techsupportANZ@cepheid.com
Brasil y Latinoamérica	+ 55 11 3524 8373	latamsupport@cepheid.com
China	+ 86 021 5406 5387	techsupportchina@cepheid.com
Francia	+ 33 563 825 319	support@cepheideurope.com
Alemania	+ 49 69 710 480 480	support@cepheideurope.com
India, Bangladesh, Bután, Nepal y Sri Lanka	+91 1800 4209 099	techsupportindia@cepheid.com
Italia	+ 39 800 902 567	support@cepheideurope.com
Sudáfrica	+ 27 861 22 76 35	support@cepheideurope.com
Reino Unido	+ 44 3303 332 533	support@cepheideurope.com
Otros países europeos, de Oriente Próximo y africanos	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	support@cepheideurope.com
Bélgica, Países Bajos y Luxemburgo	+33 563 825 319	support@cepheideurope.com
Otros países europeos, de Oriente Próximo y africanos	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	support@cepheideurope.com
Otros países no indicados	+ 1 408 400 8495	techsupport@cepheid.com



Muchas gracias.

www.Cepheid.com

