

Formazione tecnica per i clienti su Xpert® Ebola

Esclusivamente per l'utilizzo secondo la Direttiva Europea
sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (CE-IVD)



Programma di formazione

- **Xpert® Ebola***
 - Uso previsto
 - Reagenti
 - Raccolta del campione
 - Conservazione e manipolazione del kit
 - Preparazione della cartuccia
 - Controlli qualità
 - Analisi dei risultati
- **Discussione**



Obiettivi del programma di formazione

- **Al termine della formazione, l'operatore sarà in grado di:**
 - Conservare e manipolare correttamente il kit della cartuccia Xpert[®] Ebola*
 - Seguire le adeguate precauzioni di sicurezza del laboratorio
 - Prelevare e trasportare i campioni di analisi adeguati
 - Preparare una cartuccia ed eseguire il saggio
 - Refertare i vari risultati generati dal software
 - Comprendere la strategia di controllo del saggio

La soluzione Cepheid



- Disegno a doppio bersaglio: ciascun bersaglio che copre ceppi di Zaire noti
 - Nucleoproteina (NP)
 - Glicoproteina (GP)
- Controlli presenti per ogni singolo campione
 - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
 - Controllo per l'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC)
 - Controllo interno Cepheid (CIC)
- Il sistema della cartuccia a circuito chiuso riduce al minimo il rischio di contaminazione
- Risultati on-demand 24 ore al giorno, 7 giorni su 7
- Accesso casuale

Uso previsto

Il saggio Xpert® Ebola* Assay è un test RT-PCR per il rilevamento qualitativo di RNA dello **Zaire ebolavirus** in sangue venoso intero in EDTA, sangue periferico ottenuto mediante puntura del dito o tampone buccale di individui **con segni e sintomi** di malattia da virus Ebola (MVE) in concomitanza con **fattori di rischio epidemiologici**.

È importante effettuare il test con il saggio Xpert Ebola Assay solo sugli individui che soddisfano i **criteri clinici ed epidemiologici** per l'analisi dei casi sospetti.

I risultati sono destinati all'**identificazione presuntiva dello Zaire ebolavirus**. L'identificazione definitiva dell'infezione da Zaire ebolavirus richiede ulteriori test e procedure di conferma in consultazione con gli istituti di sanità pubblica e le altre autorità che ne richiedono notifica.

Bersagli e sonde

- Test RT-PCR (reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione) real time per il rilevamento dell'RNA dello Zaire ebolavirus
- **Identificazione di sequenze di geni della nucleoproteina (NP) e della glicoproteina (GP)**



- **4 sonde (NP, GP, CIC e SAC)**

Requisiti del saggio

Sistemi GeneXpert

- Software GeneXpert DX versione **v4.4 a** o successiva
- Xpertise Software versione **v6.2** o successiva

Kit per i test (CE-IVD)*

- GXEBOLA-CE-50

Materiali necessari ma non forniti

- Lancette monouso per puntura del dito
- Tamponi monouso *SWAB/E-50*
- Vortex
- Dispositivi di protezione individuale (DPI)
- Candeggina 1:10
- Etanolo al 70% o etanolo denaturato al 70%

Facoltativo

- Gruppo di continuità/dispositivo di protezione da sovratensioni
- Stampante

Buona prassi di laboratorio

Attrezzatura di protezione personale (PPE)

- Indossare camici da laboratorio, occhiali di sicurezza e guanti puliti
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento

Banco di laboratorio dedicato

- Pulire regolarmente le superfici di lavoro con:
 - ✓ Una concentrazione finale di candeggina domestica in diluizione 1:10 (da usare entro 1 giorno dalla preparazione)*
 - ✓ Etanolo al 70% o etanolo denaturato
- * *Per ulteriori informazioni consultare il Manuale dell'operatore GeneXpert*
- Dopo la pulizia, assicurarsi che le superfici di lavoro siano asciutte

Conservazione dei campioni di analisi, dei campioni e dei kit

- Conservare i campioni di analisi e i campioni lontano dal kit in modo da prevenirne la contaminazione

Apparecchiature

- Usare puntali per pipetta con filtro, se consigliato
- Seguire i requisiti del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature

Manipolazione del kit



Contenuto del kit Xpert® Ebola*

Saggio Xpert® Ebola Assay	
Numero di catalogo	GXEBOLE-CE-50
Scatola cartucce	5
Scatola kit	1
CD	File di definizione del saggio (Assay Definition File, ADF) Istruzioni per l'importazione del saggio Foglietto illustrativo (PDF)
Cartucce per kit	50 (5 scatole da 10)
Flaconi di reagente per il campione	50 x 2,5 ml
Pipette di trasferimento	50 x 1 ml



Le cartucce contengono sostanze chimiche pericolose. Per ulteriori informazioni, consultare il foglietto illustrativo e la scheda dati di sicurezza.

Conservazione e manipolazione del kit Xpert[®] Ebola*

- Conservare le cartucce e i reagenti del saggio Xpert Ebola Assay a temperature comprese fra 2 °C e 28 °C.
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- Non utilizzare provette con reagente per il prelievo non convalidate da Cepheid.
- Aprire il coperchio della cartuccia del saggio solo quando si aggiunge il campione, chiudere il coperchio e procedere con il trattamento.



Avvertenze e precauzioni

- Non agitare la cartuccia
- Non usare una cartuccia che...
 - appare bagnata, presenta perdite o se la guarnizione del coperchio sembra essere rotta
 - appare danneggiata
 - è caduta dopo essere stata estratta dalla confezione
 - è caduta o è stata agitata dopo l'aggiunta del campione
 - ha una provetta di reazione danneggiata
 - è già stata usata: ciascuna cartuccia è monouso e serve per l'esecuzione di un solo test
 - è scaduta
 - Non riutilizzare le pipette monouso usate



Avvertenze e precauzioni

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

Limitazioni del saggio Xpert[®] Ebola* Assay

- I **risultati negativi non escludono** un'eventuale infezione da Zaire ebolavirus o da altro virus Ebola e non devono essere usati come unica base per le decisioni riguardanti la gestione dei pazienti.
- Il **livello di ebolavirus** presente nel tampone di sangue e nel tampone buccale di individui nei primi stadi dell'infezione sistemica **non è noto**.
- A causa delle difficoltà nell'ottenere campioni di analisi clinici Ebola-positivi, il saggio Xpert Ebola Assay è stato **valutato con un numero limitato di campioni di analisi artificiali inoculati** con Zaire ebolavirus vivo o con RNA di Zaire ebolavirus. Il saggio non è stato valutato con sangue e tamponi buccali di individui con infezione da Zaire ebolavirus.
- I campioni di analisi di pazienti sottoposti ad **agenti terapeutici o vaccini** basati su sequenze di acidi nucleici derivate dallo Zaire ebolavirus possono esibire risultati falsi positivi o altri risultati di test che possono confondere.

Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi



Prelievo di campione di sangue intero venoso

- Prelevare i campioni di analisi di sangue intero mediante venipuntura in provette con EDTA secondo le istruzioni per l'uso del produttore
- Sono necessari almeno 100 μ l
- Tenere pronto un tampone* per procedere con la preparazione del campione di analisi

Tampone - N. di catalogo Cepheid: SWAB/E-50 per kit CE-IVD*



Importante -

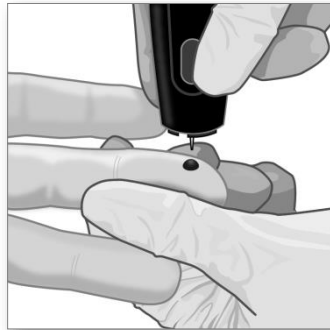
Procedere immediatamente con la fase di preparazione dei campioni per garantire che l'ebolavirus diventi inattivato

**Linee guida OMS per il prelievo sicuro di campioni ematici
<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/blood-collect-en.pdf>*

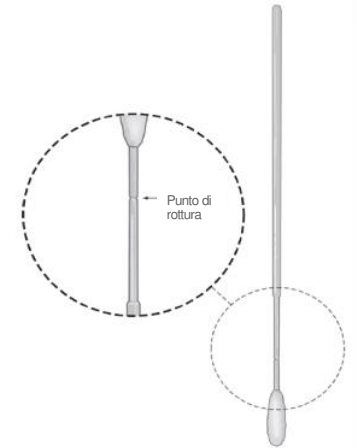
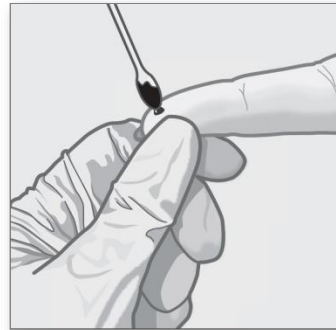
Prelievo di campione di sangue capillare mediante puntura del dito

- Usare il tampone* per prelevare campioni di analisi di sangue mediante puntura del dito
- Fare in modo che almeno i 2/3 della testa del tampone assorbano il sangue

Tampone* - N. di catalogo Cepheid: SWAB/E-50 per kit CE-IVD



Puntura con
lancetta

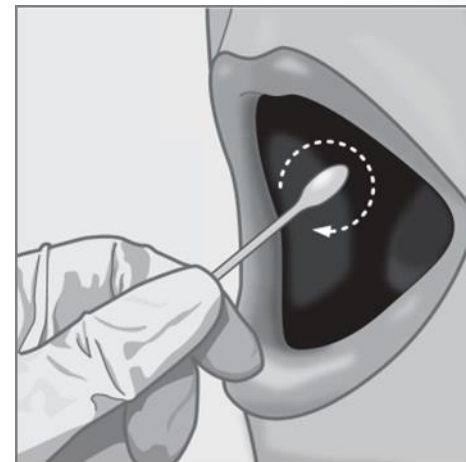


Importante -

Procedere immediatamente con la fase di preparazione dei campioni per garantire che l'ebolavirus diventi inattivato

Prelievo di campione buccale

- Usare il SWAB/E-50 per prelevare i campioni di analisi
- inserire immediatamente la punta del tampone all'interno della guancia
- Evitare che il tampone venga a contatto con qualsiasi altra superficie
- I tamponi possono essere prelevati da individui viventi o deceduti
- Prelevare il campione di analisi in conformità alle linee guida dell'OMS*
**WHO/EVD/Guidance/Lab/14.2*

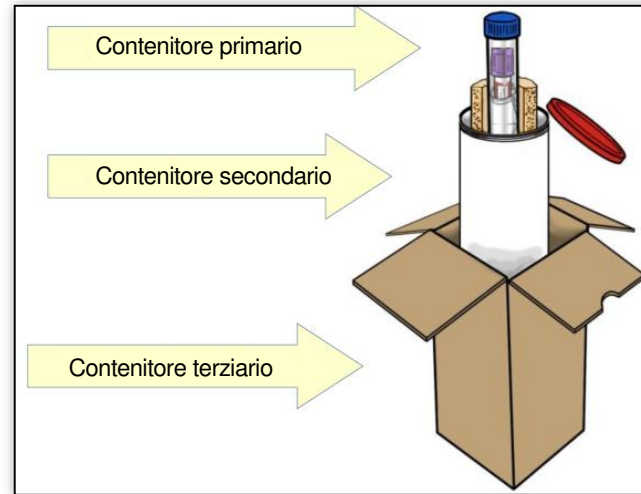


Conservazione dei campioni di analisi

Temperatura	 Tipo di campione	Durata della conservazione
2-8 °C	Campione (di sangue o buccale) trattato con reagente	72 ore
8-28 °C	Campione buccale trattato con reagente	24 ore
	Campione di sangue trattato con reagente	48 ore
28-35 °C	Campione di sangue trattato con reagente	24 ore

Trasporto dei campioni di analisi

- Trasporto dei campioni di analisi trattati con reagente per il campione nei laboratori di analisi in conformità alle linee guida dell'OMS relative al trasporto di campioni di analisi per Ebola



<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/blood-collect-en.pdf>

Preparazione della cartuccia



Tecniche corrette di manipolazione della cartuccia

Giusto

- Non toccare la provetta di reazione
- Mantenere la cartuccia in posizione verticale
- Non inclinare dopo l'aggiunta del campione



Sbagliato



Preparazione della cartuccia Xpert Ebola

Sangue venoso intero in provette EDTA

1



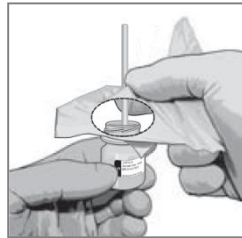
Applicare sul flacone di reagente per il campione un'etichetta con l'ID del campione e aprire il coperchio

2



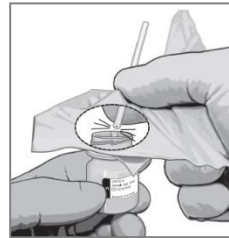
Inserire il tampone nella provetta EDTA. Lasciare assorbire per 5 secondi

3



Inserire il tampone nel flacone del reagente per il campione. Allineare la piccola scanalatura contro il margine (bordo) del flacone

4



Rompere il tampone piegandolo di lato

5



Chiudere il coperchio del flacone del reagente per il campione

6



Agitare mediante vortex il campione per 10 secondi

7



Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti

8



Applicare sul lato della cartuccia un'etichetta con ID uguale a quello del flacone del reagente per il campione. Aprire il coperchio della cartuccia

9



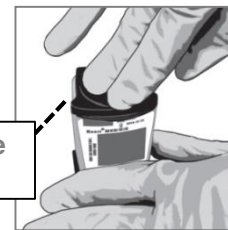
Aspirare almeno 1 ml del campione nella pipetta

10



Svuotare lentamente la pipetta nella camera per il campione della cartuccia

11



Chiudere bene il coperchio

12

Max.
30 min.



Cominciare il test su GeneXpert

Preparazione della cartuccia Xpert Ebola

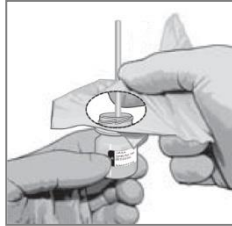
Tampone di sangue capillare mediante puntura di dito o tampone buccale

1



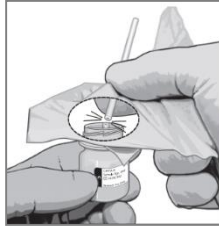
Applicare sul flacone di reagente per il campione un'etichetta con l'ID del campione e aprire il coperchio

2



Inserire il tampone nel flacone del reagente per il campione. Allineare la piccola scanalatura contro il margine (bordo) del flacone

3



Rompere il tampone piegandolo di lato

4



Chiudere il coperchio del flacone del reagente per il campione

5



Agitare il campione mediante vortex per 10 secondi

6



Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti

7



Applicare sul lato della cartuccia un'etichetta con ID uguale a quello del flacone del reagente per il campione. Aprire il coperchio della cartuccia

8



Aspirare almeno 1 ml del campione nella pipetta

9



Svuotare lentamente la pipetta nella camera per il campione della cartuccia

10



Chiudere bene il coperchio

11

Max. 30 min.
-->



Cominciare il test su GeneXpert

Esecuzione di un'analisi

1 Creare l'analisi

GeneXpert



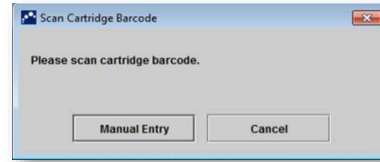
Avviare il test entro **30 minuti** dall'introduzione del campione nella cartuccia

GeneXpert
Infinity



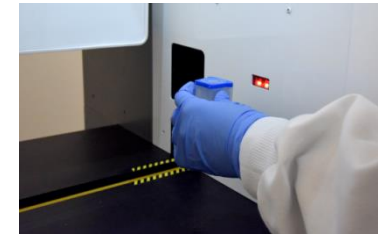
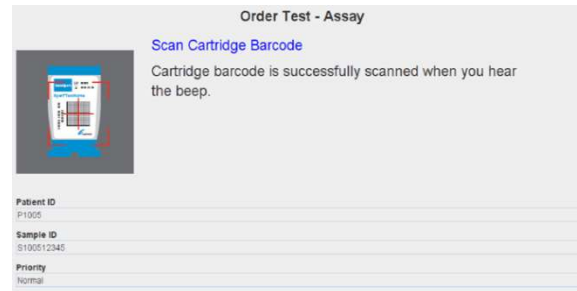
Porre la cartuccia sul nastro trasportatore entro **30 minuti** dall'introduzione del campione.

2 Eseguire la scansione dei messaggi con codici a barre: Cartuccia/ ID del paziente e/o ID del campione



Per impostazione predefinita, non fare clic su **Immissione manuale (Manual Entry)** o **Annulla (Cancel)**

3 Eseguire la scansione della cartuccia



Per i dettagli completi su come eseguire un test, consultare il foglietto illustrativo e i manuali dell'operatore GeneXpert Dx o Xpertise Dx.

Creare un test sul software GeneXpert Dx

4 Compilare i campi come richiesto

5 Il protocollo del saggio viene selezionato automaticamente

6 Il modulo viene selezionato automaticamente

NON MODIFICARLO!!!

7 Fare clic su Avvia analisi (Start Test)

8 Una spia verde lampeggerà sul modulo. Caricare la cartuccia nel modulo e chiudere lo sportello

Create Test

Patient ID

Sample ID

Patient ID 2

Last Name

Name

Select Assay Xpert® Ebola*

Select Module A3

Reagent Lot ID* 16119 Expiration Date* 2016/1/17

Test Type Specimen

Sample Type Other Other S

Notes

Start Test Scan Cartridge Barcode



Per creare un test sul software Xpertise Dx

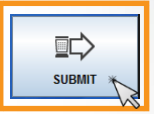
4 Compilare i campi come richiesto

Order Test - Test Information

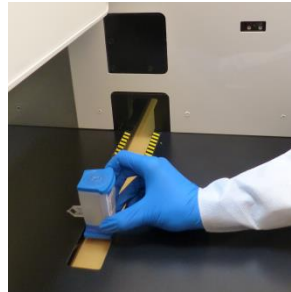
Patient ID patientid	
Sample ID sampleid	
Last Name patient	First Name id
Assay* Xpert® Ebola*	
Reagent Lot ID* 12102	Cartridge S/N* 282769448
Expiration Date* 2018/11/04	Priority Normal
Test Type Specimen	
Sample Type Other	Other Sample Type
Notes	

5 Il protocollo del saggio viene selezionato automaticamente

6 Fare clic su INVIA (SUBMIT)



7 Posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore



Protocollo automatizzato Xpert



Controlli qualità



- **Controllo del sistema – Verifica dello stato**

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

- **Controlli qualità del saggio**

- Ciascuna cartuccia Xpert è un dispositivo di test autonomo
- Cepheid ha ideato appositi metodi molecolari con controlli interni che permettono al sistema di rilevare specifiche modalità di errore in ciascuna cartuccia.
 - Controlli per la verifica della sonda (PCC)
 - Controllo interno Cepheid (CIC)
 - Controllo per l'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC)

Controlli di qualità interni

- **Controlli per la verifica della sonda (PCC)**

- Prima della fase PCR, il segnale di fluorescenza viene misurato su tutte le sonde e confrontato con le impostazioni predefinite di fabbrica per monitorare
 - reidratazione delle microsfer
 - integrità delle sonde
 - riempimento della provetta di reazione
 - stabilità del colorante

- **Controllo interno Cepheid (CIC)**

- Armored RNA[®] incluso in ogni cartuccia
 - Verifica che il trattamento del virus del campione sia avvenuto correttamente
 - Verifica la lisi, la presenza dell'organismo e rileva l'inibizione
 - Deve essere positivo in un campione negativo.
 - Può essere positivo o negativo in un campione positivo.

- **Controllo dell'adeguatezza dei campioni (SAC): HMBS (Idrossimetilbilano sintasi)**

- Garantisce che nella camera per il campione della cartuccia siano state aggiunte cellule umane

Controlli esterni disponibili in commercio

Materiale di riferimento AccuPlex™ rEbola GP/NP

Codice prodotto	Descrizione	Configurazione	Conservazione
0505-0001	Controllo positivo per GP+NP	250 µl x 5 fiale	2-8 °C

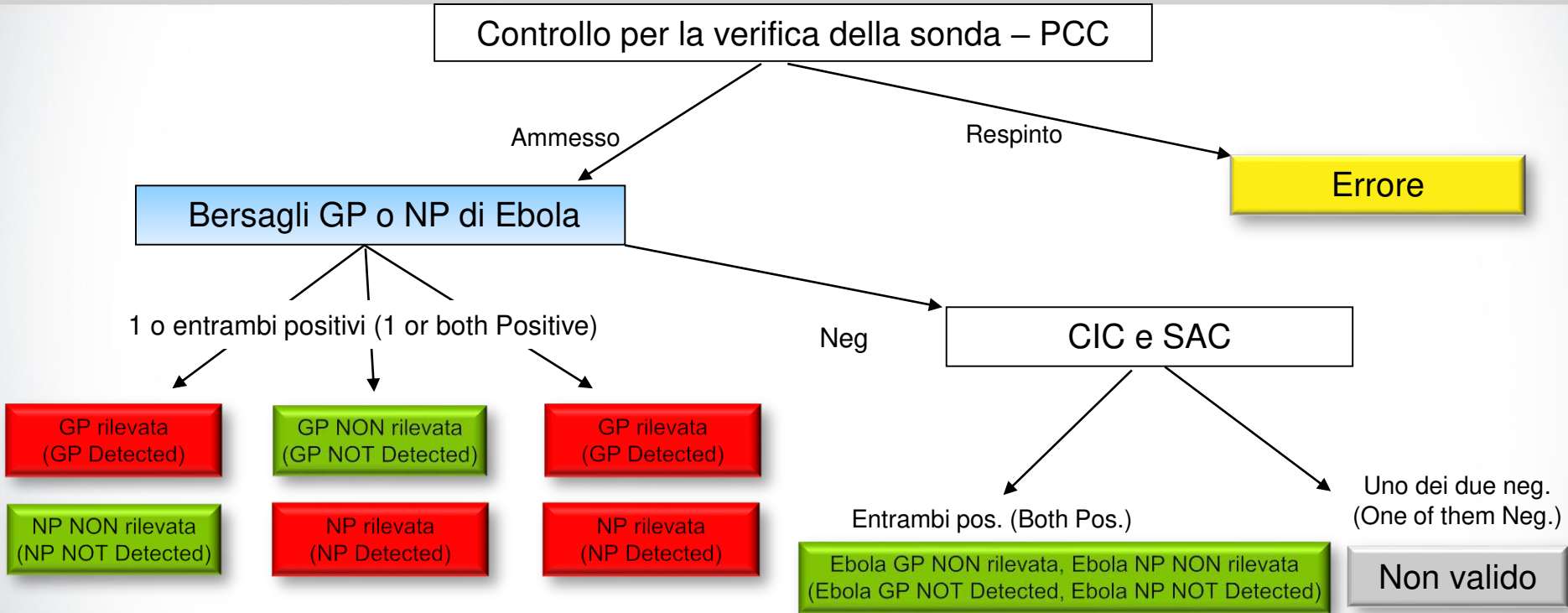
<http://www.seracare.com/>

- Oltre a quello indicato sopra, sono disponibili anche altri fornitori di materiale di controllo qualità.
- I controlli esterni devono essere usati in conformità con i requisiti degli organismi di accreditamento locali e nazionali pertinenti.

Interpretazione dei risultati

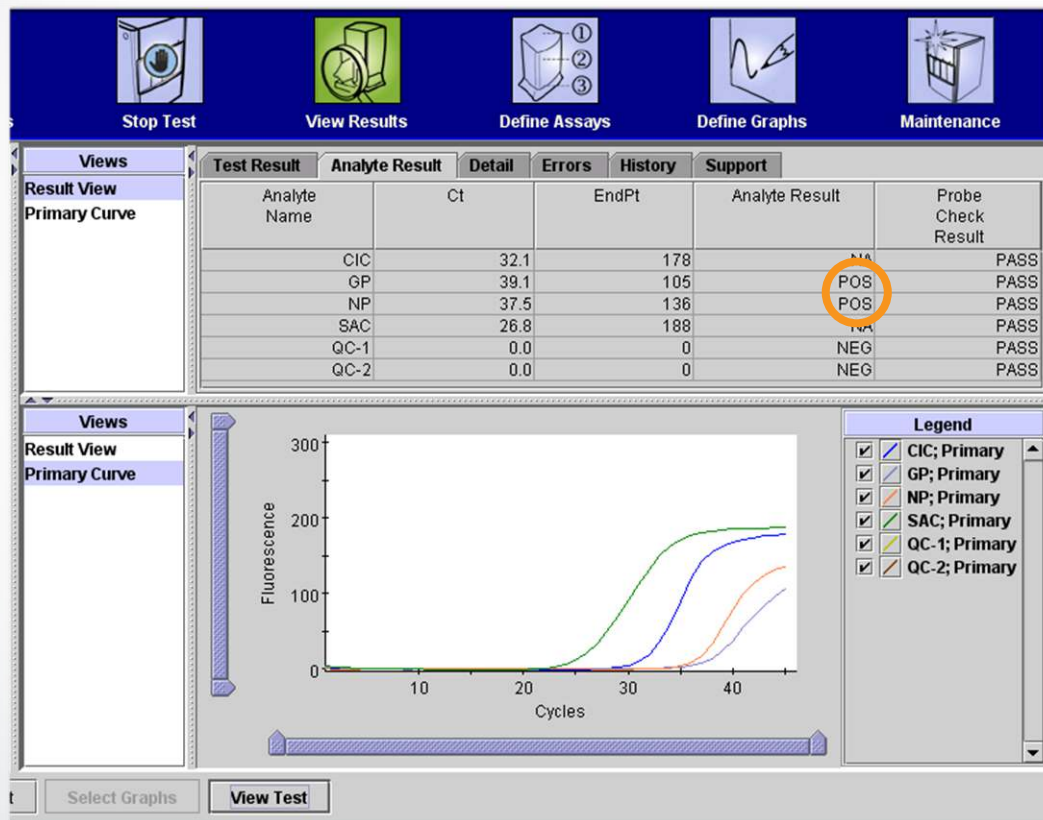


Algoritmo di interpretazione dei risultati



Ebola GP RILEVATA; Ebola NP RILEVATA (Ebola GP DETECTED, Ebola NP DETECTED)

Test Result **Ebola GP DETECTED;**
Ebola NP DETECTED

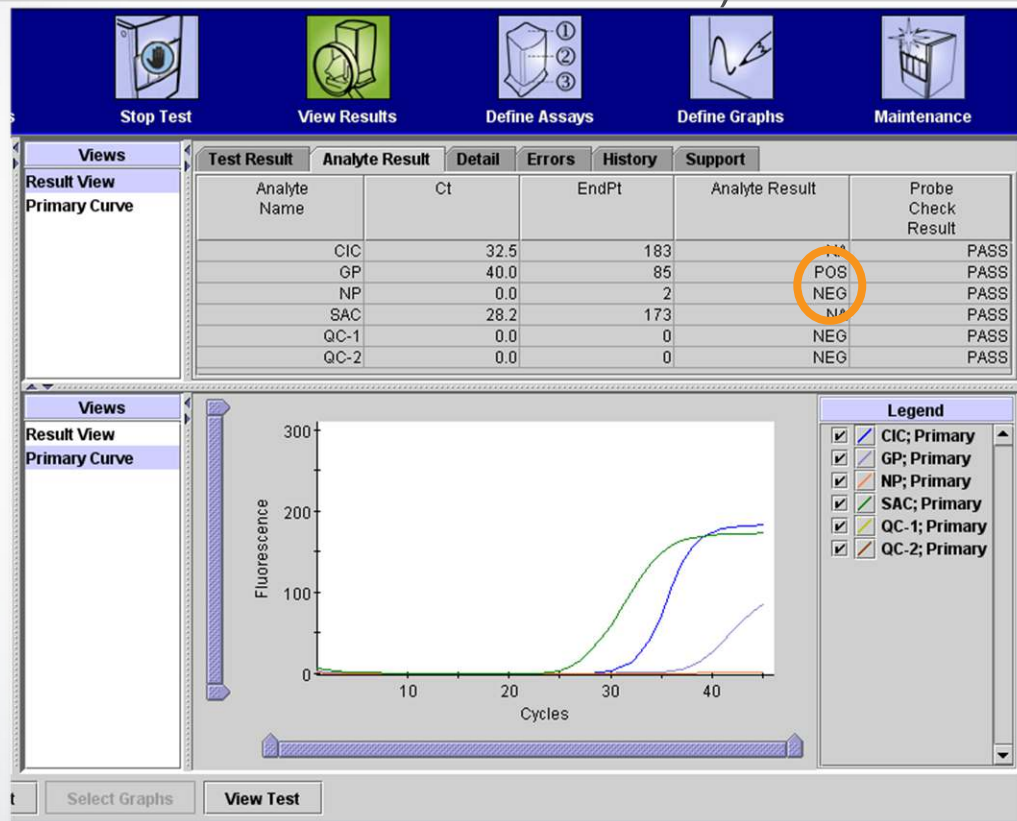


- I bersagli GP e NP per EBOLA sono stati rilevati e i valori Ct rientrano nell'intervallo di validità
- SAC: NA (non applicabile)
 - Il SAC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- CIC: NA (non applicabile)
 - Il CIC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- Verifica della sonda: RIUSCITO

Ebola GP RILEVATA; Ebola NP NON RILEVATA (Ebola GP DETECTED, Ebola NP NOT DETECTED)

Test Result

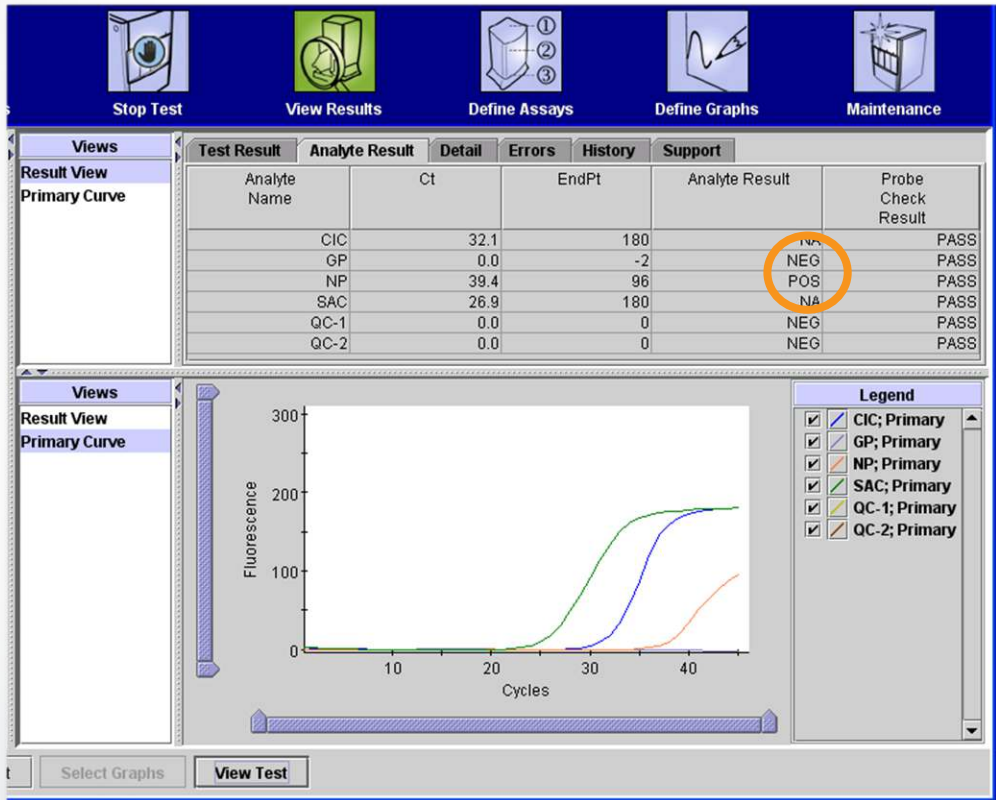
Ebola GP DETECTED;
Ebola NP NOT DETECTED



- Il bersaglio GP dell'EBOLA è stato rilevato e il valore Ct rientra nell'intervallo valido
- SAC: NA (non applicabile)
 - Il SAC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- CIC: NA (non applicabile)
 - Il CIC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- Verifica della sonda: RIUSCITO

Ebola GP NON RILEVATA; Ebola NP RILEVATA (Ebola GP NOT DETECTED; Ebola NP DETECTED)

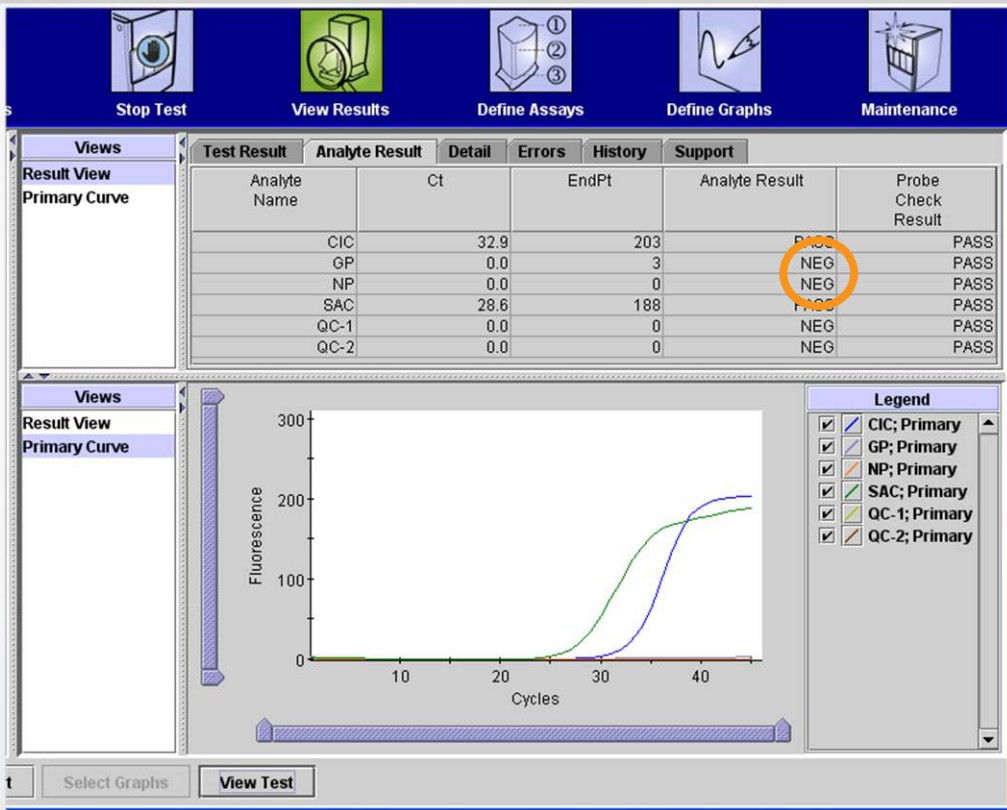
Test Result
Ebola GP NOT DETECTED;
Ebola NP DETECTED



- Il bersaglio NP dell'EBOLA è stato rilevato e il valore Ct rientra nell'intervallo valido
- SAC: NA (non applicabile)
 - Il SAC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- CIC: NA (non applicabile)
 - Il CIC viene ignorato poiché si è verificata l'amplificazione del bersaglio dell'EBOLA
- Verifica della sonda: RIUSCITO

Ebola GP NON RILEVATA; Ebola NP NON RILEVATA (Ebola GP NOT DETECTED; Ebola NP NOT DETECTED)

Test Result
Ebola GP NOT DETECTED;
Ebola NP NOT DETECTED



- I bersagli GP e NP dell'EBOLA NON sono rilevati
- SAC: RIUSCITO
 - Il SAC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- CIC: RIUSCITO
 - Il CIC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: RIUSCITO

Risoluzione dei problemi

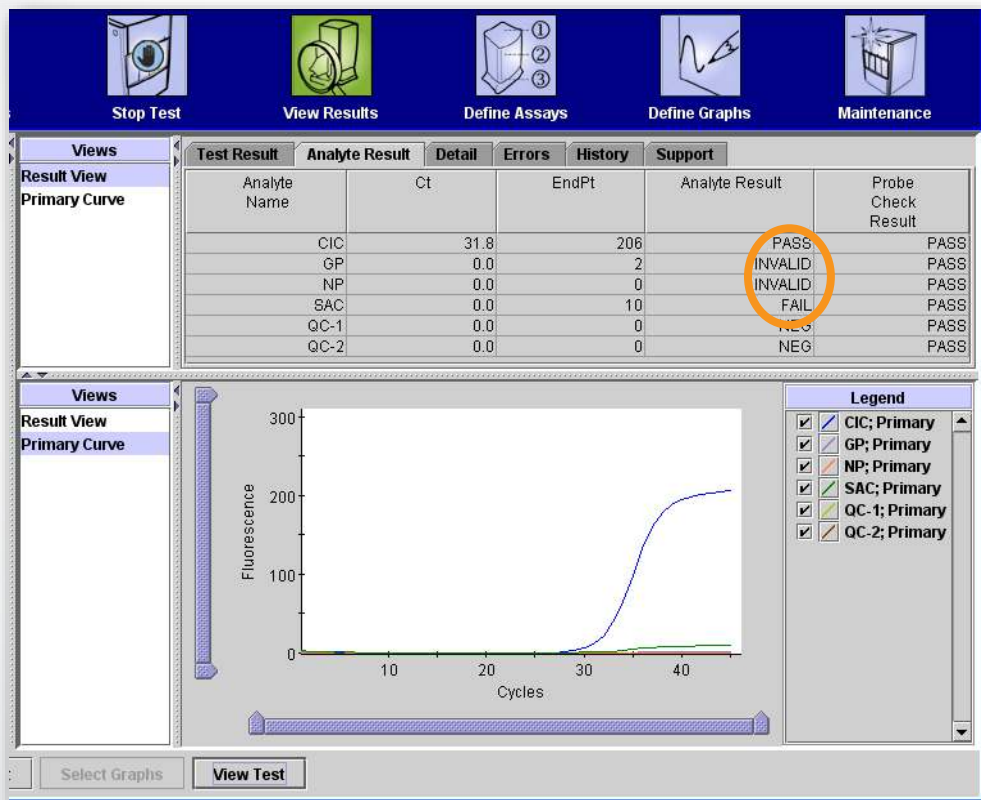


Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- Prelievo non corretto del campione di analisi
 - La carica virale contenuta nel campione di analisi è inferiore al limite di rilevamento del test
 - Non sono state valutate le prestazioni con altri tipi di campioni di analisi
- Trasporto o conservazione non corretti del campione di analisi prelevato
 - Le condizioni di conservazione e trasporto sono specifiche per i campioni di analisi
 - Per le istruzioni sulla corretta manipolazione, consultare il foglietto illustrativo
- Procedura di analisi non corretta
 - Apportando modifiche alle procedure di analisi si possono alterare le prestazioni del test
 - La stretta osservanza delle istruzioni del foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erranei

Risultato NON VALIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**



- Non è possibile stabilire la presenza o l'assenza dei bersagli Ebola GP e NP.
- SAC: RESPINTO (FAIL); il segnale non ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e l'endpoint è minore dell'impostazione minima
- Verifica della sonda – RIUSCITO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi

Possibili cause

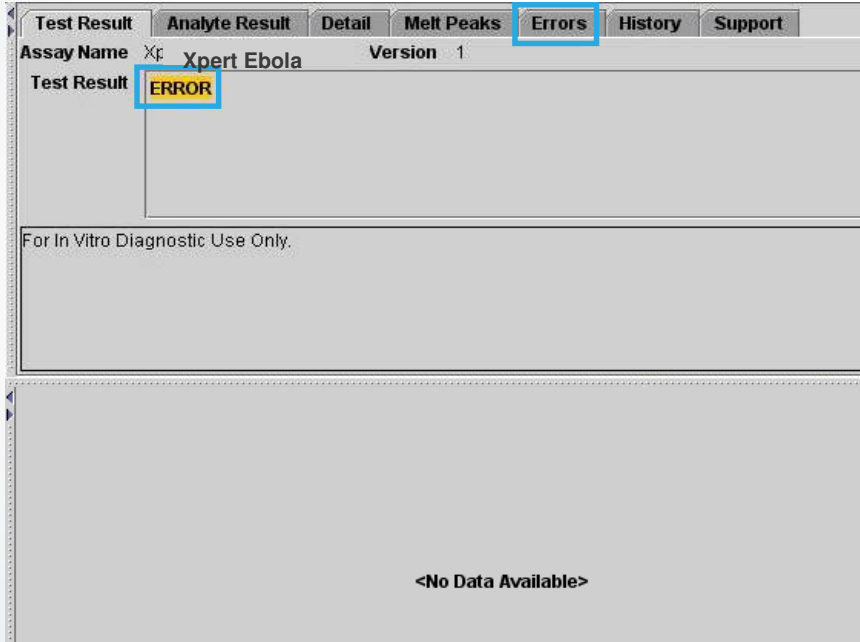
- Prelievo o preparazione del campione impropri
- Presenza di sostanze interferenti nel campione

Soluzione

- Ripetere il test con una nuova cartuccia

ERRORE (ERROR)

ERROR



Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dei bersagli NP O GP. Ripetere il test in base alla Procedura di ripetizione del test, come descritto nelle istruzioni per l'uso.

GP/NP: NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

SAC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

Verifica della sonda: RESPINTO (FAIL); uno o più risultati della verifica della sonda non sono validi

Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore deriva dal superamento del limite massimo di pressione rispetto all'intervallo accettabile o dal guasto di un componente del sistema.

Soluzione

Ripetere il test con una nuova cartuccia.

NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

NO RESULT

The screenshot shows a software interface with a top navigation bar containing tabs: Test Result, Analyte Result, Detail, Melt Peaks, Errors, History, Messages, and Support. Below the navigation bar, the 'Assay Name' is 'Xpert Ebola' and the 'Version' is '1'. The main area displays 'Test Result' with a highlighted box containing the text 'NO RESULT'. At the bottom of the interface, there is a disclaimer: 'For In Vitro Diagnostic Use Only.'

Possibili cause

NESSUN RISULTATO (NO RESULT) indica che i dati raccolti sono insufficienti.

- Il test è stato interrotto con il pulsante di arresto del test
- Guasto elettrico

Soluzione

- Ristabilire l'alimentazione elettrica
- Ripetere il test con una nuova cartuccia.

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di GP/NP.

NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test in corso.

GP/NP: NESSUN RISULTATO
(NO RESULT)

SAC: NESSUN RISULTATO
(NO RESULT)

Verifica della sonda: NA (non applicabile)

Procedura di ripetizione del test

1



Gettare la cartuccia usata

Per lo smaltimento delle cartucce seguire le linee guida di sicurezza del proprio istituto

2



Procurarsi il campione residuo, miscelare come descritto nel foglietto illustrativo

Se il volume del campione residuo è insufficiente o se ripetendo il test si continua ad ottenere un risultato NON VALIDO (INVALID), ERRORE (ERROR) o NESSUN RISULTATO (NO RESULT), prelevare un nuovo campione

3



Procurarsi una nuova cartuccia

Applicare appositamente sulla nuova cartuccia una etichetta con la dicitura "Ripetizione del test"

Trattare il campione come indicato nel foglietto illustrativo

4



Eeguire il test sul sistema



Assistenza Tecnica

- Prima di contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:
 - Nome del prodotto
 - Numero di lotto
 - Numero di serie del sistema
 - Messaggi di errore (se presenti)
 - Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio del computer
- Registrare il reclamo online utilizzando il seguente link <http://www.cephoid.com/us/support> :
Creare una richiesta di assistenza

Grazie.



www.Cepheid.com

