

# Formazione tecnica sul saggio Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load

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

*Centro di formazione Cepheid*



# Programma di formazione

- **Xpert® HBV Viral Load**
  - Utilità clinica
  - Reagenti
  - Prelievo del campione
  - Conservazione e manipolazione dei 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 maneggiare correttamente il kit della cartuccia Xpert® HBV Viral Load e i kit di prelievo dei campioni
  - Seguire le adeguate precauzioni di sicurezza del laboratorio
  - Prelevare i campioni di analisi del tipo giusto e trasportarli
  - Preparare la cartuccia ed eseguire il test Xpert® HBV Viral Load
  - Comprendere la strategia di controllo del saggio
  - Refertare i vari risultati generati dal software

# La soluzione Cepheid



- Rileva e quantifica il bersaglio HBV
  - Risultati affidabili con un intervallo di linearità da 10 a 1.000.000.000 IU/ml
- Controlli a bordo per ogni singolo campione
  - Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)
  - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
  - Standard quantitativi interni (IQS) alto (H) e basso (L)
- Risultati in circa 60 minuti
- Sistema della cartuccia a circuito chiuso per ridurre al minimo il rischio di contaminazione
- Risultati on-demand 24 ore al giorno, 7 giorni su 7
- Accesso casuale

# Uso previsto

- Il saggio Xpert® HBV Viral Load è un test diagnostico *in vitro* formulato per la **determinazione quantitativa** rapida del **DNA del virus dell'epatite B (HBV)** nel siero o nel plasma umano (EDTA) da soggetti con infezione cronica da HBV utilizzando i sistemi automatizzati GeneXpert®.
- Il saggio Xpert® HBV Viral Load è stato validato per la quantificazione del DNA dell'HBV nei **genotipi A, B, C, D, E, F, G, H**
- Il saggio è previsto per essere utilizzato insieme al quadro clinico e ad altri marcatori di laboratorio come indicatore della **prognosi della malattia** e come ausilio nella determinazione della risposta virale al trattamento antiretrovirale, misurata in base alle variazioni dei livelli di DNA dell'HBV nel plasma o nel siero.
- Il test non è indicato per l'uso come test dell'HBV nello screening dei donatori di sangue, né come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HBV.

# Bersagli e sonde

- **Bersaglio**
  - DNA dell'HBV
  
- **Sonde**
  - 1 sonda per standard quantitativo interno - Alto
  - 1 sonda per standard quantitativo interno - Basso
  - 1 sonda per HBV

# Requisiti del saggio Xpert® HBV Viral Load

## Sistemi GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **versione 4.7b** o successiva / Software Infinity Dx **versione 6.4b** o successiva

## Kit per i test (CE-IVD)

- GXHBV-VL-CE-10

## Prelievo del campione

- Provette di raccolta con EDTA-K2/EDTA-PPT o provette di raccolta del siero

## Altri materiali

- Dispositivi di protezione individuale (DPI)
- Candeggina 1:10
- Etanolo al 70% o etanolo denaturato al 70%
- Centrifuga per la preparazione del plasma/siero

## Facoltativo

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

# Buona prassi di laboratorio

## Dispositivi di protezione individuale (DPI)

- Indossare camici da laboratorio 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:
  - ✓ Candeggina per uso domestico con diluizione 1:10
  - ✓ Soluzione di etanolo al 70%
- 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 con filtro, laddove consigliato
- Seguire i requisiti del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature



# Manipolazione del kit



# Contenuto del kit Xpert® HBV Viral Load

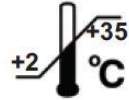
Numero di catalogo	GXHBV-VL-CE-10
Test per kit	10
CD del kit	File di definizione del saggio (Assay Definition File, ADF)
	Istruzioni per l'importazione del saggio
	Foglietto illustrativo (PDF)
Pipette di trasferimento	10 (1 ml)
Conservazione	2-35 °C



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

# Avvertenze e precauzioni

- Conservare le cartucce e i reagenti del saggio Xpert® HBV Viral Load a una temperatura compresa tra 2 °C e 35 °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 solo per aggiungere il campione, chiudere il coperchio e procedere con l'analisi
- Non sostituire i reagenti del saggio Xpert® HBV Viral Load con altri reagenti

# 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



*Smaltire le cartucce e i reagenti del saggio Xpert® HBV Viral Load nel rispetto delle linee guida sullo smaltimento dei materiali pericolosi del proprio istituto e del proprio Paese*

# 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® HBV Viral Load

- Le prestazioni del saggio Xpert® HBV Viral Load non sono state accertate con campioni di analisi diversi da quelli validati, ovvero **siero e plasma**
- Le prestazioni del test con il saggio Xpert® HBV Viral Load non sono state esaminate con campioni di analisi trattati con metodi diversi da quelli descritti nel foglietto illustrativo
- La mancata osservanza delle procedure previste per il saggio può far sì che il sistema generi risultati falsi negativi
- Gli inibitori presenti nei campioni possono generare risultati non validi

*Per informazioni dettagliate, consultare il foglietto illustrativo attuale.*



# Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi



# Prelievo dei campioni di analisi




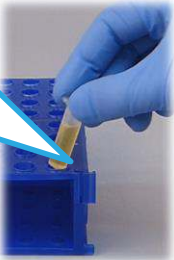



- Il sangue intero deve essere raccolto in provette di raccolta con EDTA-K2, EDTA-PPT o provette di raccolta del siero e centrifugato per separare il plasma/siero dai globuli rossi come da istruzioni del produttore. Non usare provette con eparina!



- Se si utilizza la pipetta di trasferimento inclusa nel kit, la pipetta deve essere riempita con plasma o siero fino alla quarta tacca (1 ml)
- Se si utilizza una pipetta di precisione, trasferire 600  $\mu$ l di plasma o siero



# Conservazione e trasporto dei campioni di analisi

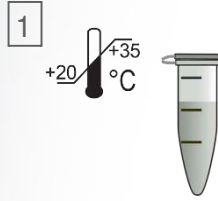
	Prima di eseguire il test	Temperatura (°C)	Durata della conservazione
	Sangue intero anticoagulato in EDTA		24 ore
			72 ore
	Plasma/Siero		24 ore
			7 giorni
			6 settimane

I campioni di plasma/siero sono stabili per un massimo di tre cicli di congelamento/scongelo.

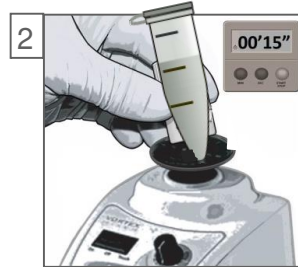
# Preparazione della cartuccia



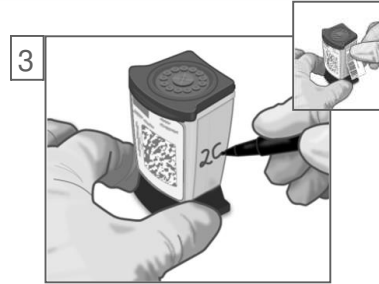
# Preparazione della cartuccia – Siero o plasma



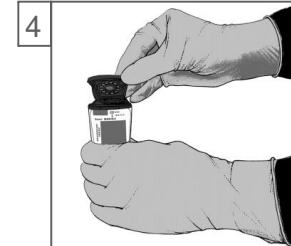
Se si utilizzano campioni congelati o refrigerati, lasciarli completamente scongelare ed equilibrare a temperatura ambiente



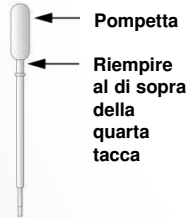
Agitare mediante vortex il campione equilibrato per 15 secondi. Se il campione di analisi è torbido, centrifugarlo per alcuni secondi



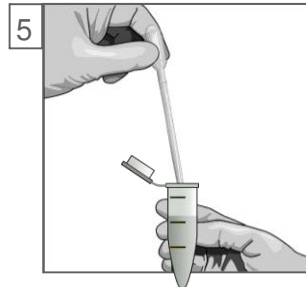
Applicare sul lato della cartuccia un'etichetta con l'ID del campione



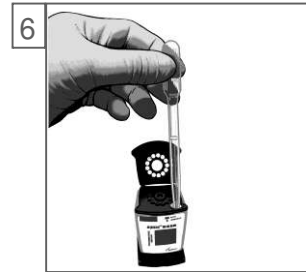
Aprire il coperchio della cartuccia



\*Pipetta di trasferimento del saggio HBV VL



Pipettare almeno 1 ml di campione utilizzando la pipetta in dotazione\*



Svuotare lentamente la pipetta nella camera per il campione della cartuccia



Chiudere bene il coperchio

Avviare il test sul sistema GeneXpert entro 4 ore

# Esecuzione di un'analisi

## 1 Creare un test

GeneXpert



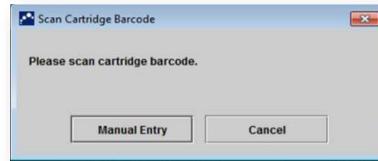
Iniziare il test entro **4 ore** dall'introduzione del campione nella cartuccia.

GeneXpert  
Infinity

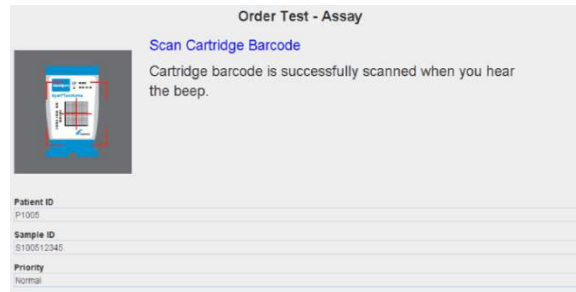


Porre la cartuccia sul nastro trasportatore entro **30 minuti** dall'aggiunta del campione.

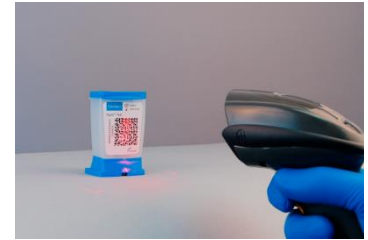
## 2 Messaggi sulla scansione del codice a barre: Cartuccia/ ID del paziente e/o ID del campione



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



## 3 Eseguire la scansione della cartuccia



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

# 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 HBV Viral Load  
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

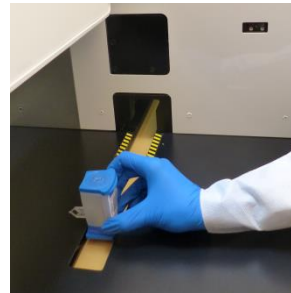


# Per creare un test sul software Xpertise Dx

- 4 Compilare i campi come richiesto
- 5 Il protocollo del saggio viene selezionato automaticamente
- 6 Fare clic su INVIA (SUBMIT)
- 7 Posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore

**Order Test - Test Information**

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



# Protocollo automatizzato Xpert





# Controlli qualità





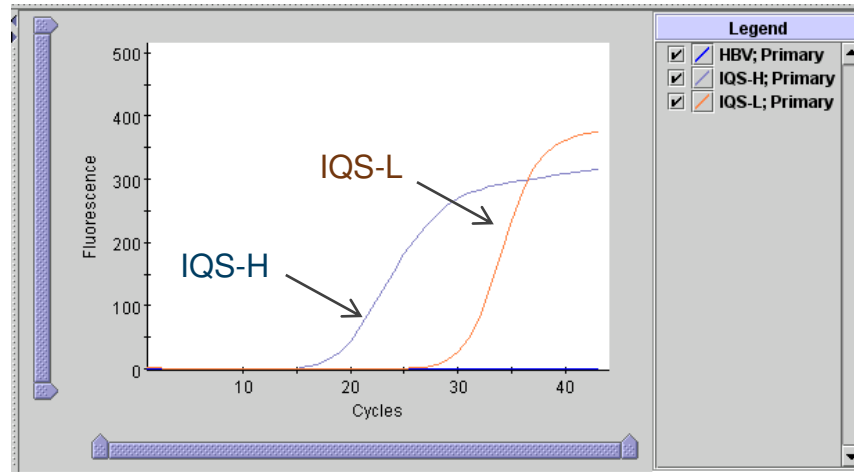
- **“Controlli qualità” del saggio Xpert® HBV Viral Load**
  - Ciascuna cartuccia Xpert è un dispositivo di test autonomo
  - Cepheid ha ideato appositi metodi molecolari con controlli interni che permettono al sistema di rilevare specifiche modalità di errore in ciascuna cartuccia
    - Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)
    - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
    - Standard quantitativi interni (IQS)

# Controlli di qualità interni

- **Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)**
  - Verifica che il volume corretto di campione venga aggiunto alla cartuccia
- **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 per monitorare
    - reidratazione delle microsfere
    - integrità delle sonde
    - riempimento della provetta di reazione
    - stabilità del colorante
- **Standard quantitativo interno alto e basso (IQS-H e IQS-L)**
  - Due plasmidi linearizzati con una sequenza non correlata all'HBV, sotto forma di una microsfera asciutta
  - Si utilizzano per calcolare la concentrazione di DNA dell'HBV nel campione
  - Rilevano l'inibizione del saggio di PCR in tempo reale associata al campione, fungendo quindi come controllo per il trattamento dei campioni (SPC)
  - I valori di fluorescenza e Ct IQS basso (Low) e IQS alto (High) devono essere sempre compresi nell'intervallo valido

# Standard quantitativi interni (IQS)

- L'IQS-H ha un valore Ct più basso rispetto all'IQS-L
  - IQS-H Standard quantitativo interno alto
  - IQS-L Standard quantitativo interno basso



# Controlli esterni disponibili in commercio

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

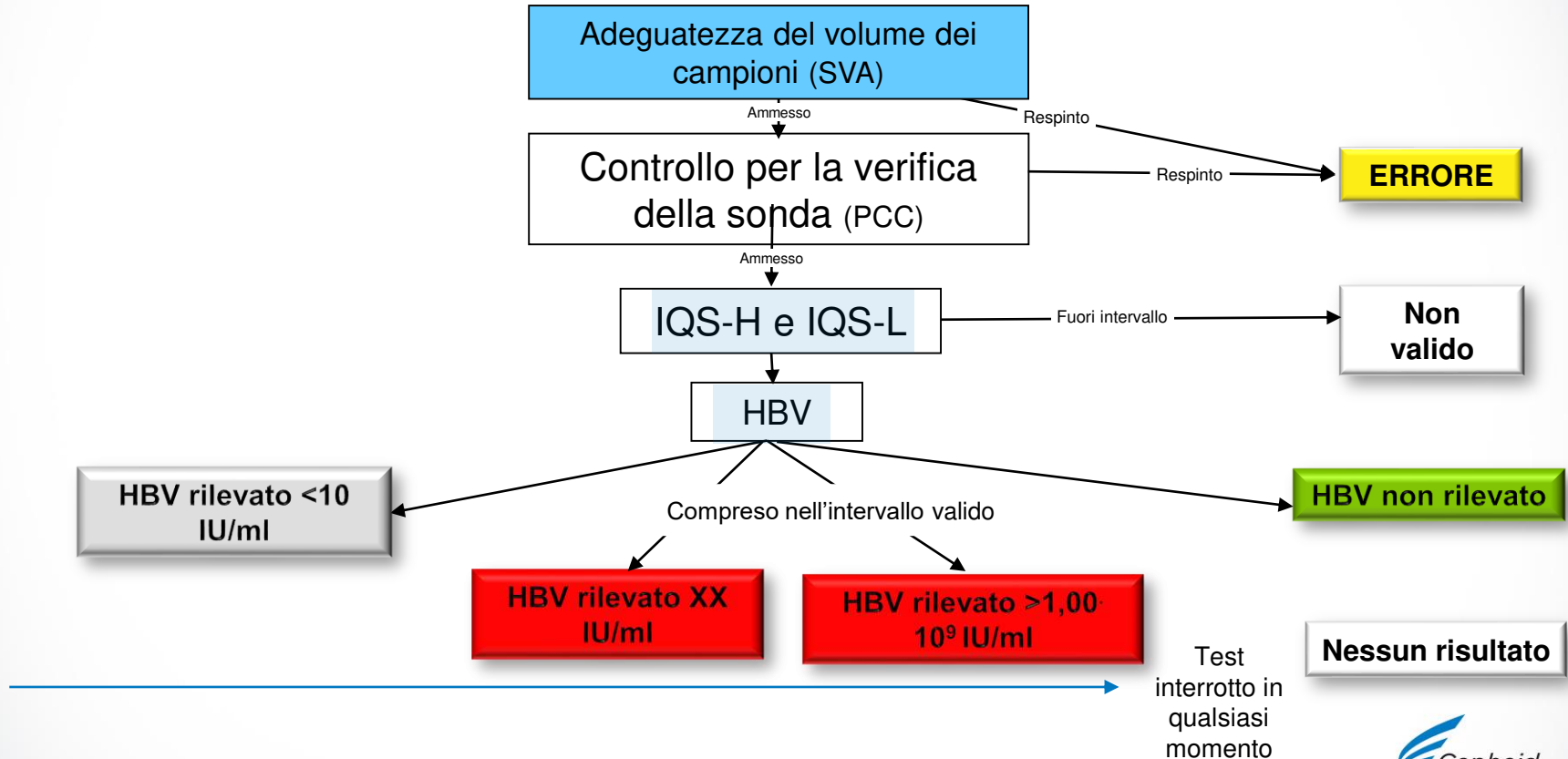
Codice prodotto	Descrizione	Configurazione	Conservazione
965003	Controllo alto AcroMetrix HBV	1 ml x 5 flaconcini	≤ -20 °C
965002	Controllo medio AcroMetrix HBV	1 ml x 5 flaconcini	≤ -20 °C
965001	Controllo basso AcroMetrix HBV	1 ml x 5 flaconcini	≤ -20 °C

- Oltre a quello indicato sopra, esistono anche molti 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.

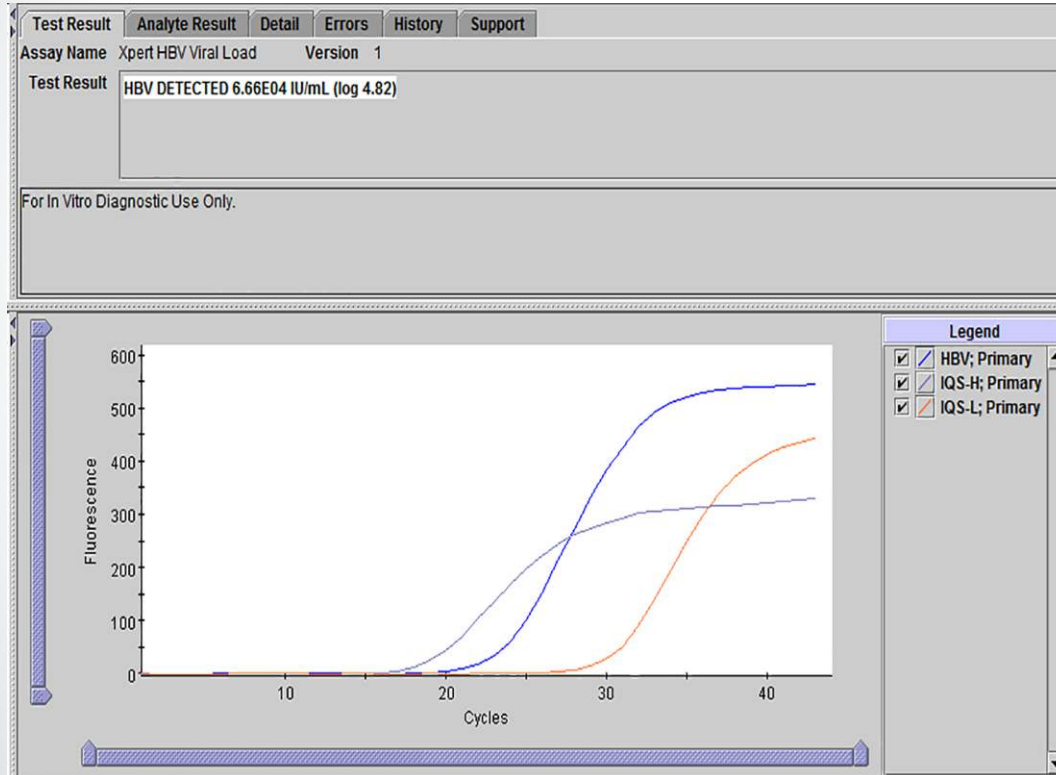
# Interpretazione dei risultati



# Algoritmo di interpretazione dei risultati



# HBV RILEVATO 6,66 E04 IU/ml (HBV DETECTED 6.66 E04 IU/mL)

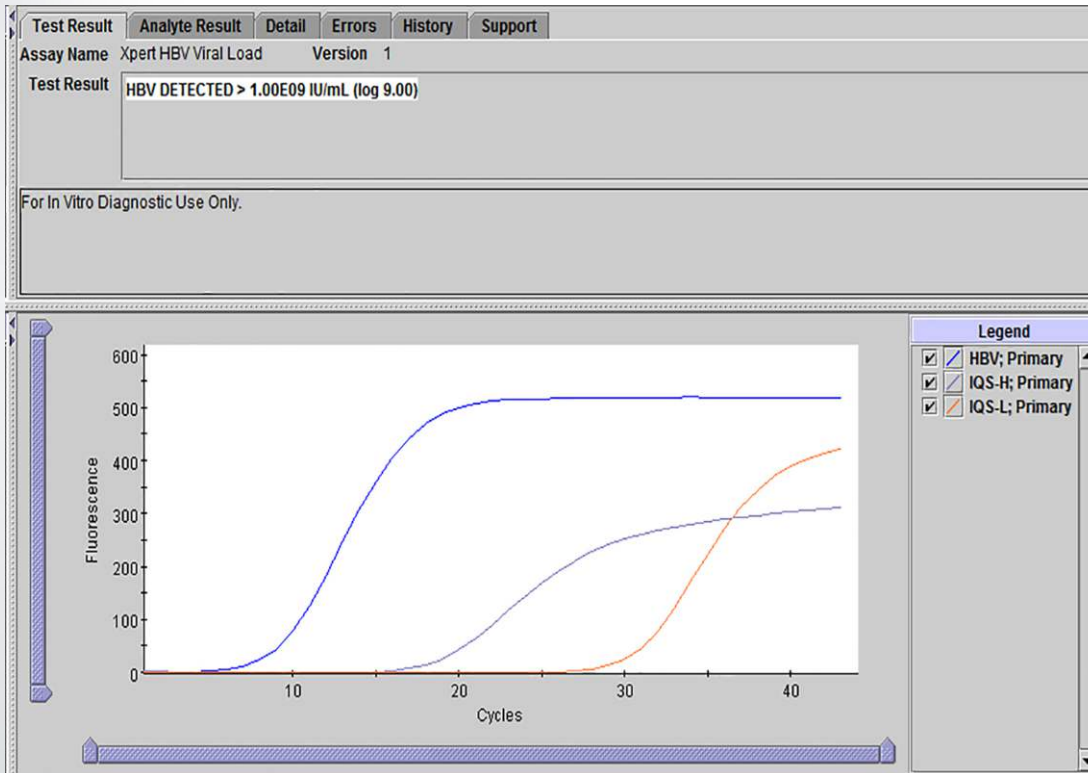


- Il DNA dell'HBV è rilevato a un valore quantitativo
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

**Calcolo di esempio:**

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

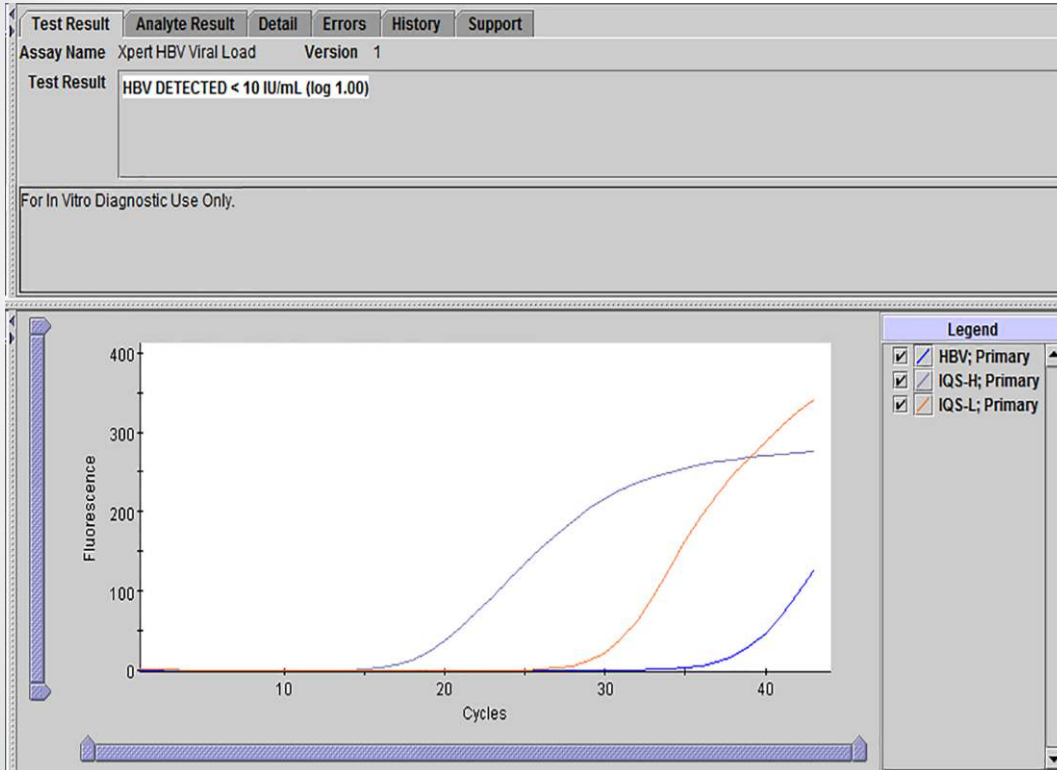
# HBV RILEVATO $>1,00 \text{ E}09 \text{ IU/ml}$ (HBV DETECTED $>1.00\text{E}09 \text{ IU/mL}$ )



- Il DNA dell'HBV è rilevato al di sopra dell'intervallo quantitativo del saggio
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

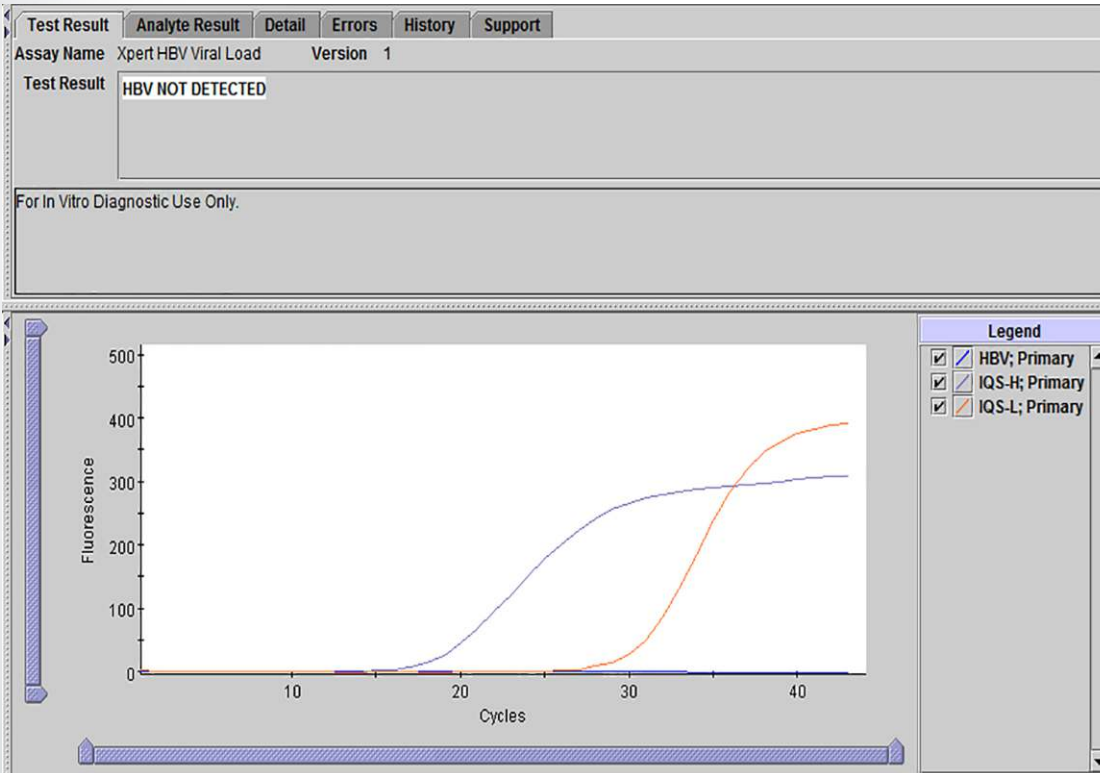


# HBV RILEVATO <10 IU/ml (HBV DETECTED < 10 IU/mL)



- Il DNA dell'HBV è rilevato al di sotto dell'intervallo quantitativo del saggio
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

# HBV NON RILEVATO (HBV NOT DETECTED)



- Il DNA dell'HBV NON è stato rilevato
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
  - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

# Risoluzione dei problemi

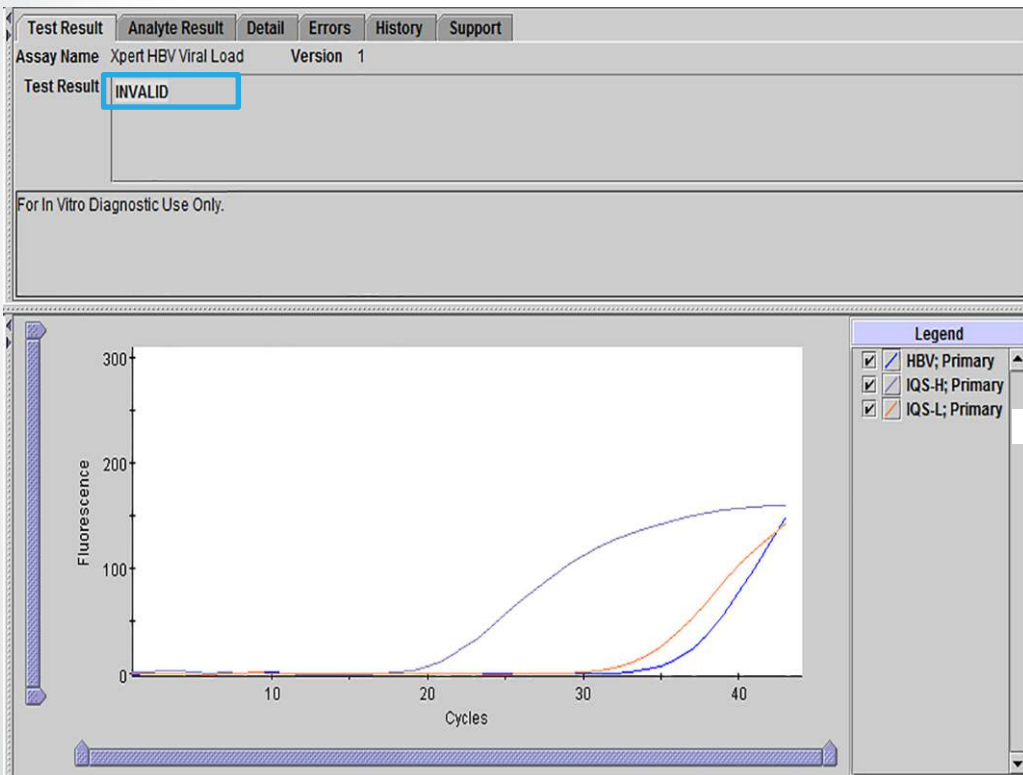


# Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- **Prelievo non corretto del campione di analisi**
  - Non sono state valutate le prestazioni con altri dispositivi di prelievo e altri tipi di campioni di analisi
- **Trasporto o conservazione non corretti del campione di analisi prelevato**
  - Per le istruzioni sulla corretta manipolazione, consultare il foglietto illustrativo
- **Procedura di analisi non corretta**
  - Modifiche alle procedure di analisi, errori tecnici e scambio di campioni possono influire sui risultati dell'analisi
  - La stretta osservanza delle istruzioni del foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erranei
- **Sostanza interferente**
  - In presenza di sostanze interferenti si possono ottenere risultati falsi negativi o risultati non validi

# Risultato NON VALIDO (INVALID)

INVALID



Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di DNA dell'HBV

- IQS-H e/o IQS-L – RESPINTO (FAIL)

Le soglie del ciclo del controllo quantitativo interno non rientrano nell'intervallo valido

- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

- Cause possibili (per ulteriori dettagli consultare il manuale dell'operatore):

- Prelievo non corretto del campione (ovvero, utilizzo di una provetta contenente eparina)
- Preparazione non corretta del campione
- Conservazione non corretta delle cartucce
- Inefficiente trattamento del campione nella cartuccia
- Presenza di inibitori nel campione
- Riempimento insufficiente della provetta o presenza di bolle nella provetta PCR

- Soluzione

- Ripetere il test con una nuova cartuccia e un nuovo campione

# Interferenza del saggio

- Sostanze potenzialmente interferenti (per ulteriori dettagli, consultare il foglietto illustrativo)
  - Complessivamente sono state valutate 5 sostanze endogene
  - È stato dimostrato che la presenza di queste sostanze endogene a livelli elevati **non influisce** sulla specificità del saggio, né interferisce con il rilevamento dell'HBV

Sostanza	Concentrazione analizzata
Albumina	9 g/dl
Bilirubina	20 mg/dl
Emoglobina	500 mg/dl
DNA umano	0,4 mg/dl
Trigliceridi	3000 mg/dl

- È stato dimostrato che le sostanze farmaceutiche sotto elencate **non interferiscono con la quantificazione** né con la specificità del saggio Xpert HBV Viral Load

Pool	Farmaci
1	Zidovudina, Saquinavir, Claritromicina, Interferone-alfa-2b, Ritonavir, Ombitasvir, Paritaprevir, Dasabuvir, Didanosina
2	Abacavir solfato, Fosamprenavir, Peg-Interferone-alfa-2a, Ribavirina, Entecavir, Adefovir Dipivoxil
3	Tenofovir disoproxil fumarato, Lamivudina, Indinavir solfato, Ganciclovir, Valganciclovir HCl, Acyclovir, Paroxetina, Telbivudina
4	Stavudina, Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtide, Ciprofloxacina, Fluoxetina
5	Nevirapina, Nelfinavir, Azitromicina, Valaciclovir, Sertralina, Tenofovir alafenamide

# Risultato ERRORE (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			

Il controllo di adeguatezza del volume dei campioni (SVA) non ha soddisfatto i criteri di accettazione convalidati.

Codice di errore	Causa	Soluzione
<b>2096</b>	Non è stato aggiunto alcun campione	<ul style="list-style-type: none"><li>– Assicurarsi che il campione venga aggiunto nella cartuccia</li><li>– Assicurarsi che la cartuccia venga caricata entro 4 ore dopo l'aggiunta del campione</li></ul>
<b>2097</b>	Il campione aggiunto è insufficiente	<ul style="list-style-type: none"><li>– Assicurarsi che il volume di campione minimo richiesto venga aggiunto nella cartuccia</li><li>– Assicurarsi che la cartuccia venga caricata entro 4 ore dopo l'aggiunta del campione</li></ul>



# 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 sulla nuova cartuccia l'apposita etichetta con la dicitura "Ripetizione del test"

Trattare il campione come indicato nel foglietto illustrativo

4



Eeguire il test sul sistema GeneXpert





# 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
- Registra il reclamo utilizzando il seguente link <http://www.cepheid.com/us/support> - **Creare una richiesta di assistenza (Create a Support Case)**

Regione	Telefono	E-mail assistenza tecnica
USA	+ 1 888 838 3222	<a href="mailto:techsupport@cepheid.com">techsupport@cepheid.com</a>
Australia e Nuova Zelanda	+ 1800 107 884 (AU) + 0800 001 028 (NZ)	<a href="mailto:techsupportANZ@cepheid.com">techsupportANZ@cepheid.com</a>
Brasile e America Latina	+ 55 11 3524 8373	<a href="mailto:latamsupport@cepheid.com">latamsupport@cepheid.com</a>
Cina	+ 86 021 5406 5387	<a href="mailto:techsupportchina@cepheid.com">techsupportchina@cepheid.com</a>
Francia	+ 33 563 825 319	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Germania	+ 49 69 710 480 480	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
India, Bangladesh, Bhutan, Nepal e Sri Lanka	+91 1800 4209 099	<a href="mailto:techsupportindia@cepheid.com">techsupportindia@cepheid.com</a>
Italia	+ 39 800 902 567	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Sud Africa	+ 27 861 22 76 35	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Regno Unito	+ 44 3303 332 533	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Altri Paesi in Europa, Medio Oriente e Africa	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Belgio, Paesi Bassi e Lussemburgo	+33 563 825 319	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Altri Paesi in Europa, Medio Oriente e Africa	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Altri Paesi non elencati	+ 1 408 400 8495	<a href="mailto:techsupport@cepheid.com">techsupport@cepheid.com</a>



Grazie.



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