

# Formação técnica para o cliente Xpert® Ebola

Apenas para utilização com CE-IVD



# Agenda da formação

- **Xpert® Ebola\***
  - Utilização prevista
  - Reagentes
  - Colheita de amostras
  - Conservação e manuseamento do kit
  - Preparação do cartucho
  - Controlos de qualidade
  - Análise dos resultados
- **Discussão**



# Objetivos da formação

- **No final da formação, o utilizador será capaz de:**
  - Armazenar e manusear devidamente o kit do cartucho do teste Xpert<sup>®</sup> Ebola\*
  - Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório
  - Colher e transportar as amostras apropriadas
  - Preparar um cartucho e executar o ensaio
  - Comunicar os vários resultados gerados pelo software
  - Compreender a estratégia de controlo do ensaio

# A solução Cepheid



- Desenho de duplo alvo: cada alvo cobre estirpes Zaire conhecidas
  - Nucleoproteína (NP)
  - Glicoproteína (GP)
- Controlos no sistema para cada amostra individual
  - Controlo de verificação da sonda (PCC)
  - Controlo de adequação da amostra (SAC)
  - Controlo interno da Cepheid (CIC)
- O sistema de cartucho fechado minimiza o risco de contaminação
- Resultados a pedido 24/7
- Acesso aleatório

# Utilização prevista

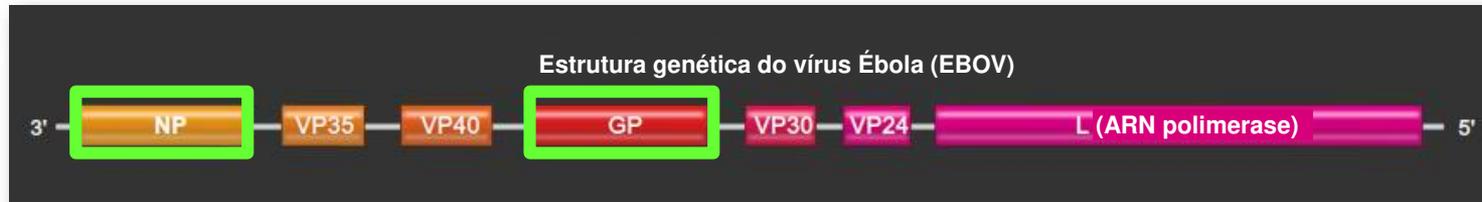
O ensaio Xpert® Ebola\* é um teste de RT-PCR destinado à deteção qualitativa de ARN do vírus **Ébola Zaire** em sangue total venoso com EDTA, sangue periférico obtido por punção digital ou exsudado bucal obtido por zaragatoa de indivíduos **com sinais e sintomas** de doença por vírus Ébola (DVE) juntamente com **fatores de risco epidemiológicos**.

Não se devem realizar testes com o ensaio Xpert Ebola se o indivíduo não satisfizer os **critérios clínicos e epidemiológicos** para a realização de testes de casos suspeitos.

Os resultados destinam-se à **identificação presumível do vírus Ébola Zaire**. A identificação definitiva da infeção por vírus Ébola Zaire exige a realização de testes e procedimentos de confirmação adicionais, consultando as autoridades de saúde pública ou outras autoridades que tenham de ser notificadas.

# Alvos e sondas

- Teste de reação de transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) qualitativo em tempo real para a detecção de ARN do vírus Ébola Zaire
- **Deteção das sequências dos genes da nucleoproteína (NP) e glicoproteína (GP)**



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

# Requisitos do ensaio

## GeneXpert Systems

- Software GeneXpert Dx **v4.4 a** ou posterior
- Software Xpertise **v6.2** ou posterior

## Kits de teste (CE-IVD)\*

- GXEBOLA-CE-50

## Materiais necessários, mas não fornecidos

- Lancetas descartáveis para a punção digital
- Zaragatoas descartáveis *Ref.ª SWAB/E-50*
- Vórtex
- Equipamento de proteção individual (EPI)
- Lixívia 1:10
- Etanol desnaturado ou etanol a 70%

## Opcional

- Unidade de alimentação ininterrupta (UPS)/Protetor de sobretensão
- Impressora

# Boas práticas de laboratório

## Equipamento de proteção individual (EPI)

- Usar batas, óculos de proteção e luvas limpos
- Trocar de luvas entre processamentos de amostras

## Área da bancada de laboratório

- Limpar as superfícies de trabalho a intervalos regulares com:
  - ✓ Lixívia doméstica com cloro numa concentração final com diluição de 1:10 (utilizada no prazo de 1 dia após a preparação)\*
  - ✓ Etanol a 70% ou etanol desnaturado
- \* Consulte o Manual do utilizador do GeneXpert para obter detalhes
- Depois de limpar, certificar-se de que as superfícies de trabalho estão secas

## Conservação de amostras e kits

- Conservar as amostras longe do kit para prevenir a contaminação

## Equipamento(s)

- Utilizar pontas de pipeta com filtro, quando recomendado
- Seguir os requisitos do fabricante relativamente à calibração e manutenção do(s) equipamento(s)

# Manuseamento do kit



# Conteúdo do kit Xpert® Ebola\*

Ensaio Xpert® Ebola	
Número de catálogo	<b>GXEBOLE-CE-50</b>
Caixa de cartuchos	5
Caixa de kits	1
CD	Ficheiro de definição do ensaio (ADF — Assay Definition File) Instruções de importação do ensaio Folheto informativo (PDF)
Cartuchos por kit	50 (5 caixas de 10)
Frascos de reagente de amostra	52 x 2,5 ml
Pipetas de transferência	50 x 1 ml



Os cartuchos contêm substâncias químicas perigosas - consulte o folheto informativo e a ficha de dados de segurança para obter informação mais detalhada.

# Conservação e manuseamento do kit Xpert<sup>®</sup> Ebola\*

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert Ebola entre 2 °C e 28 °C
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas
- Não utilize tubos de colheita de reagente não validados pela Cepheid
- Abra a tampa do cartucho de teste apenas para adicionar a amostra, feche a tampa e prossiga com o processamento



# Advertências e precauções

- Não agite o cartucho
- Não utilize um cartucho que...:
  - pareça húmido, com fugas ou se o selo da tampa parecer estar partido
  - pareça danificado
  - tenha caído depois de o ter retirado da embalagem
  - tenha caído ou sido agitado depois de lhe ter adicionado a amostra
  - tenha um tubo de reação danificado
  - tenha sido utilizado: cada cartucho é de utilização única para processamento de um teste
  - tenha ultrapassado o prazo de validade
  - Não reutilize pipetas descartáveis usadas



# Advertências e precauções

- Amostras biológicas, dispositivos de transferência e cartuchos usados devem ser considerados como tendo potencial de transmissão de agentes infecciosos que exigem precauções padrão.
- Siga os procedimentos relativos a resíduos ambientais da vossa instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos.
- Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as diretrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).

# Limitações do ensaio Xpert<sup>®</sup> Ebola\*

- Os resultados negativos não excluem a infecção por vírus Ébola Zaire ou outros vírus Ébola e não devem ser utilizados como a única base para decisões sobre o tratamento dos pacientes.
- Desconhece-se o nível do vírus Ébola presente no sangue e em exsudado bucal obtido por zangaratoa de indivíduos com infecção sistêmica precoce.
- Como é difícil obter amostras clínicas positivas para Ébola, o ensaio Xpert Ebola foi avaliado com números limitados de amostras artificiais contaminadas com vírus Ébola Zaire vivo ou ARN de vírus Ébola Zaire. O ensaio não foi avaliado com sangue e zangaratoa bucal de indivíduos com infecção por vírus Ébola Zaire.
- As amostras de pacientes a quem tenham sido administradas terapêuticas ou vacinas com base em sequências de ácidos nucleicos derivadas do vírus Ébola Zaire poderão apresentar resultados de teste falso-positivos ou outros resultados que suscitem perplexidade.

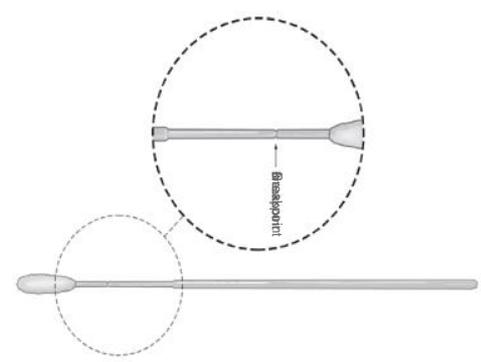
# Colheita, conservação e transporte das amostras



# Colheita de amostra de sangue total venoso

- Colha as amostras de sangue total obtidas por punção venosa em tubos com EDTA, seguindo as instruções do fabricante
- É necessário um volume mínimo de 100 µl
- Tenha uma zaragatoa\* pronta para prosseguir com a preparação da amostra

Zaragatoa\* - Referência SWAB/E-50 da Cepheid para kits CE-IVD



## Importante:

**Avance imediatamente para o passo de preparação da amostra, para garantir a inativação do vírus Ébola**

\*WHO guidelines on how to safely collect blood samples  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/blood-collect-en.pdf>

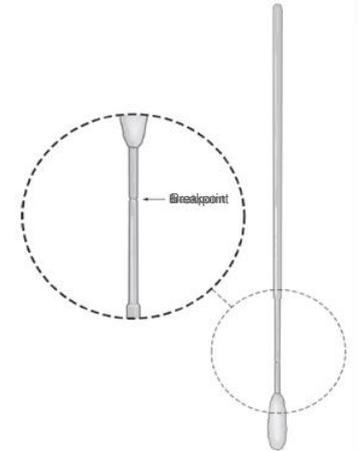
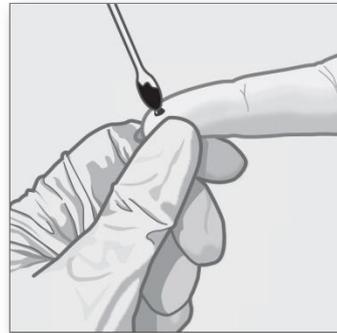
# Colheita de amostra de sangue capilar por punção digital

- Utilize a zaragatoa\* para colher amostras de sangue obtidas por punção digital
- Assegure a absorção de sangue em pelo menos 2/3 da cabeça da zaragatoa

Zaragatoa\* - Referência SWAB/E-50 da Cepheid para kits CE-IVD



Punção com lanceta

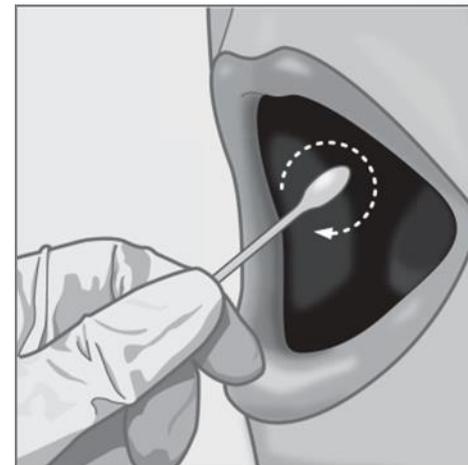


## Importante:

**Avance imediatamente para o passo de preparação da amostra, para garantir a inativação do vírus Ébola**

# Colheita de amostra bucal

- Utilize a SWAB/E-50 para colher amostras
- Leve imediatamente a ponta da zaragatoa ao interior da bochecha
- Evite tocar com a zaragatoa em qualquer outra superfície
- A colheita com zaragatoa pode ser feita em pessoas vivas ou mortas
- Colha a amostra de acordo com as diretrizes da OMS\*  
\**WHO/EVD/Guidance/Lab/14.2.*

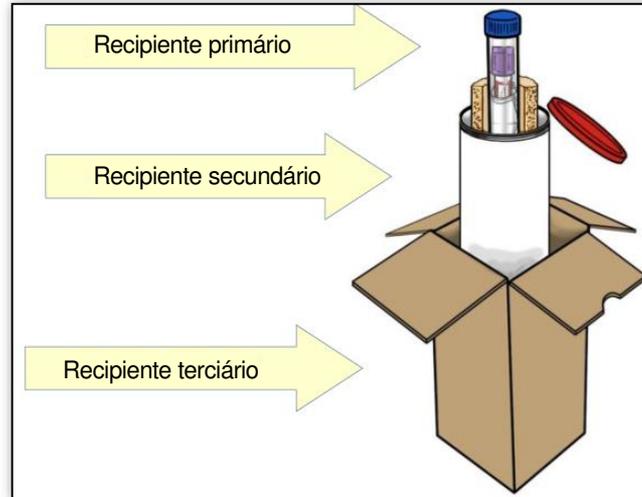


# Conservação de amostras

Temperatura	 Tipo de amostra	Tempo de conservação
2 °C-8 °C	Amostra tratada com reagente (sangue ou bucal)	72 horas
8 °C-28 °C	Amostra <b>bucal</b> tratada com reagente	24 horas
	Amostra de <b>sangue</b> tratada com reagente	48 horas
28 °C-35 °C	Amostra de <b>sangue</b> tratada com reagente	24 horas

# Transporte de amostras

- Transporte de amostras tratadas com reagente de amostra para laboratórios de teste de acordo com as diretrizes da OMS relativas ao transporte de amostras de Ébola



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

# Preparação do cartucho



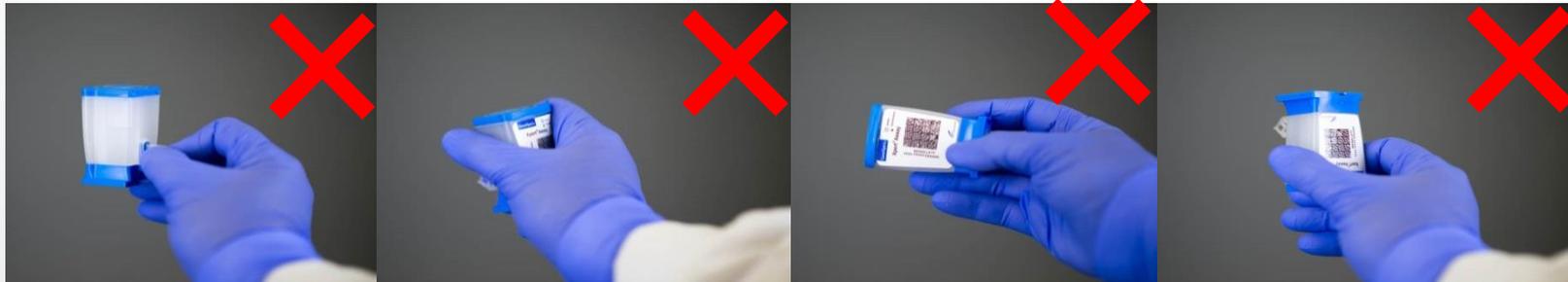
# Técnicas apropriadas de manuseamento do cartucho

## Correta

- Não toque no tubo de reação
- Mantenha o cartucho na vertical
- Não incline após adição da amostra



## Incorreta



# Preparação do cartucho Xpert Ebola

## Sangue total venoso em tubos com EDTA

1



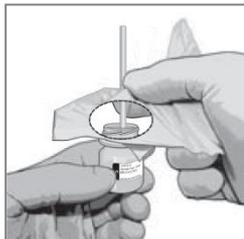
Identifique o frasco de reagente de amostra (RA) com a ID da amostra e abra a tampa

2



Coloque a zaragatoa no tubo com EDTA. Deixe absorver durante 5 segundos

3



Insira a zaragatoa no frasco de RA. Alinhe a pequena ranhura contra a extremidade (bordo) do tubo

4



Parta a zaragatoa, dobrando-a para um lado

5



Feche a tampa do frasco de RA

6



Agite a amostra num agitador de vórtex durante 10 segundos

7



Incube à temperatura ambiente durante 20 minutos

8



Identifique a parte lateral do cartucho com a mesma ID que o frasco de RA. Abra a tampa do cartucho

9



Aspire, pelo menos, 1 ml da amostra na pipeta

10



Esvazie lentamente a pipeta para a câmara da amostra do cartucho

11



Feche a tampa com firmeza

12

Máx. 30 min.



Inicie o teste no GeneXpert

# Preparação do cartucho Xpert Ebola

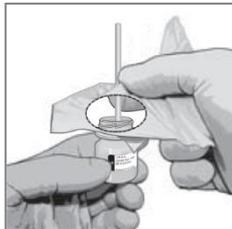
Zaragatoa de sangue capilar de punção digital ou exsudado bucal obtido por zaragatoa

1



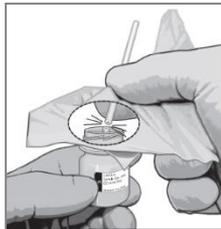
Identifique o frasco de reagente de amostra (RA) com a ID da amostra e abra a tampa

2



Insira a zaragatoa no frasco de RA. Alinhe a pequena ranhura contra a extremidade (bordo) do tubo

3



Parta a zaragatoa, dobrando-a para um lado

4



Feche a tampa do frasco de RA

5



Agite a amostra num agitador de vórtex durante 10 segundos

6



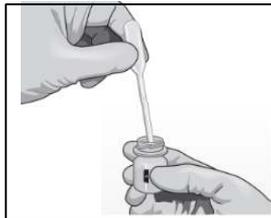
Incube à temperatura ambiente durante 20 minutos

7



Identifique a parte lateral do cartucho com a mesma ID que o frasco de RA. Abra a tampa do cartucho

8



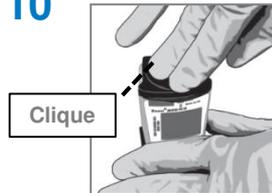
Aspire, pelo menos, 1 ml da amostra na pipeta

9



Esvazie lentamente a pipeta para a câmara da amostra do cartucho

10



Feche a tampa com firmeza

11

Máx. 30 min.



Inicie o teste no GeneXpert

# Executar um teste

## 1 Criar um teste

GeneXpert



Inicie o teste dentro de **30 minutos** após a adição da amostra ao cartucho

GeneXpert  
Infinity



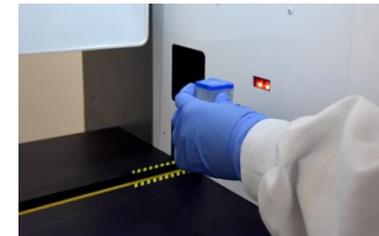
Coloque o cartucho no tapete rolanete dentro de **30 minutos** após a adição da amostra.

## 2 Ler as mensagens de código de barras: ID do cartucho/paciente e/ou amostra



Por *predefinição*, não clique em **Entrada manual (Manual Entry)** nem em **Cancelar (Cancel)**

## 3 Ler o cartucho



“Para detalhes completos sobre como executar um teste, consulte o folheto informativo e os manuais do utilizador do GeneXpert Dx ou do Xpertise Dx”.

# Criar um teste no software GeneXpert Dx

4 Preencha os campos, conforme necessário

5 O protocolo do ensaio é selecionado automaticamente

6 O módulo é selecionado automaticamente  
**NÃO O ALTERE!!!**

7 Clique em Iniciar teste (Start Test)

8 Uma luz verde vai piscar no módulo Coloque o cartucho no módulo e feche a porta

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



# Criar um teste no software Xpertise Dx

4 Preencha os campos, conforme necessário

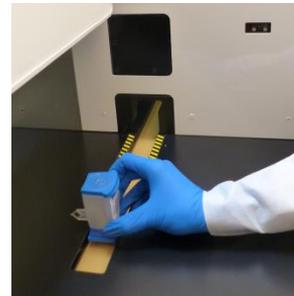
5 O protocolo do ensaio é selecionado automaticamente

6 Clique em ENVIAR (SUBMIT)

7 Coloque o cartucho na correia transportadora

**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® Ebola*	
<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>	



# Protocolo Xpert automatizado



# Controlos de qualidade



- **Controlo do sistema — verificação do estado**

- O controlo do sistema verifica o sistema ótico, a temperatura do módulo e a integridade mecânica de cada cartucho.
- Se os controlos do sistema falharem, há indicação de ERROR (ERRO) para o resultado do teste.

- **Controlos de qualidade do ensaio**

- Cada cartucho Xpert constitui um dispositivo de teste autónomo
- A Cepheid concebeu métodos moleculares específicos de modo a incluir controlos internos que permitem ao sistema detetar modos de falha específicos em cada cartucho.
  - Controlos de verificação da sonda (PCC — Probe Check Controls)
  - Controlo interno da Cepheid (CIC)
  - Controlo de adequação da amostra (SAC)

# Controlos de qualidade internos

- **Controlos de verificação da sonda (PCC — Probe Check Controls)**
  - Antes do passo de PCR, o sinal de fluorescência é medido em todas as sondas e comparado com as predefinições de fábrica para monitorizar
    - a reidratação das esferas
    - a integridade da sonda
    - o enchimento do tubo de reação
    - a estabilidade do corante
- **Controlo interno da Cepheid (CIC)**
  - Armored RNA<sup>®</sup> fornecido em todos os cartuchos
    - Verifica se o processamento do vírus da amostra é adequado
    - Verificam a lise, a presença do organismo e detetam a inibição
    - Têm de ser positivos numa amostra negativa
    - Podem ser negativos ou positivos numa amostra positiva
- **Controlo de adequação da amostra (Sample Adequacy Control, SAC): HMBS (hidroximetilbilano sintase)**
  - Assegura que foram adicionadas células humanas à câmara da amostra do cartucho

# Controlos externos disponíveis no mercado

## Material de referência de AccuPlex™ rEbola GP/NP

Referência	Descrição	Configuração	Conservação
0505-0001	Controlo positivo GP+NP	250 ul x 5 frascos	2 °C-8 °C

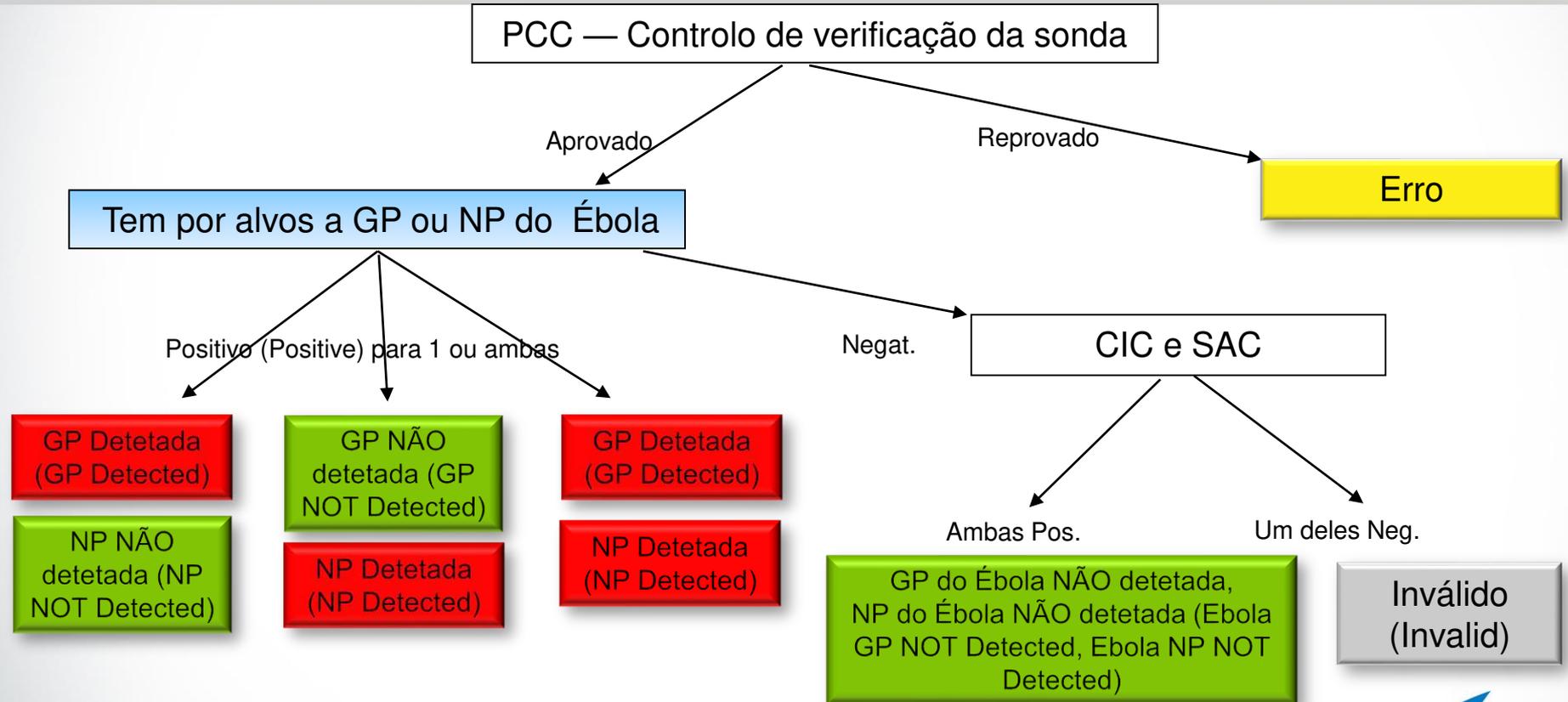
<http://www.seracare.com/>

- Estão igualmente disponíveis outros fornecedores de material de controlo de qualidade, para além do acima citado.
- Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estatais, conforme aplicável

# Interpretação dos resultados

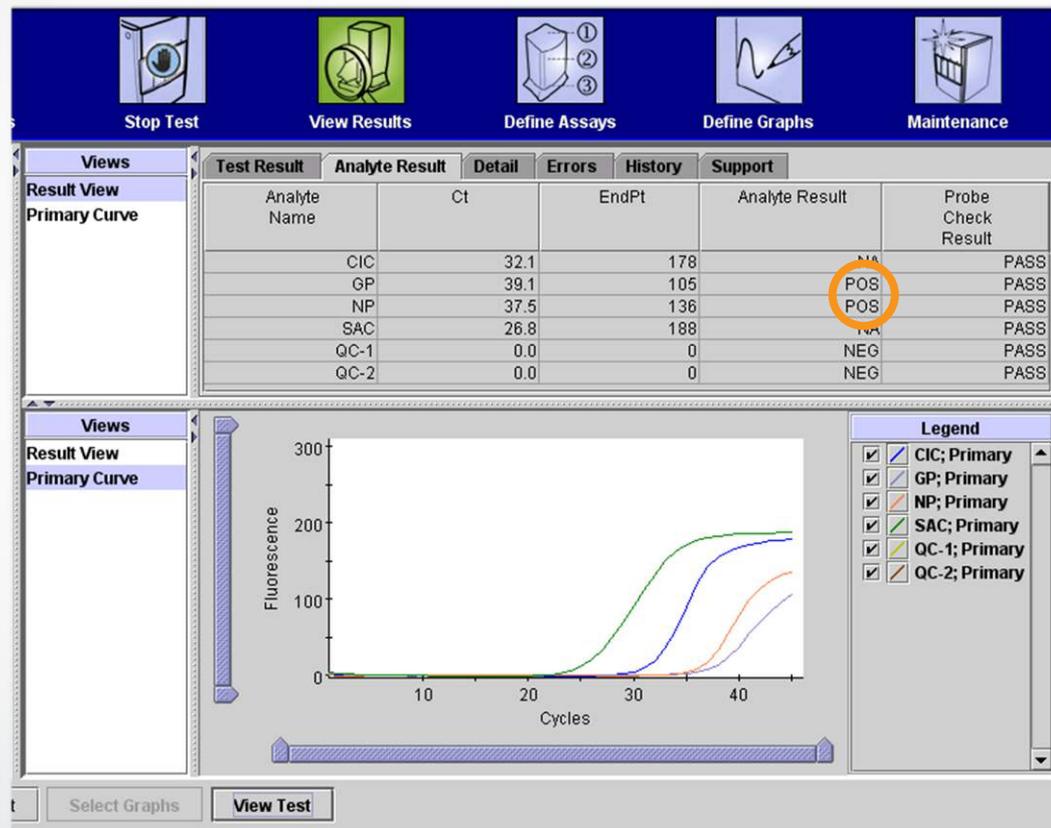


# Algoritmo de interpretação dos resultados



# GP do Ébola DETETADA; NP do Ébola DETETADA (Ebola GP DETECTED; Ebola NP DETECTED)

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

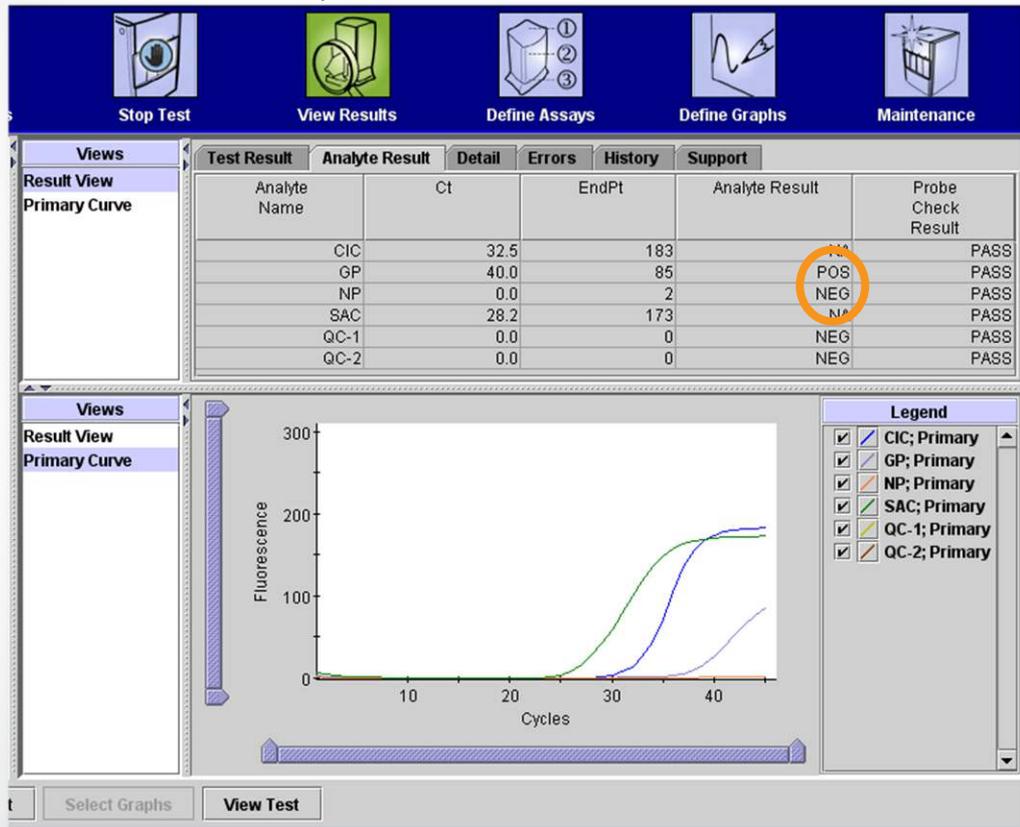


- Os alvos GP e NP do ÉBOLA são detetados e os valores de Ct situam-se dentro do intervalo válido
- SAC: NA (não aplicável)
  - O SAC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- CIC: NA (não aplicável)
  - O CIC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- Verificação da sonda: APROVADO

# GP do Ébola DETETADA; NP do Ébola NÃO DETETADA (Ebola GP DETECTED; Ebola NP NOT DETECTED)

Test Result

**Ebola GP DETECTED;**  
**Ebola NP NOT DETECTED**

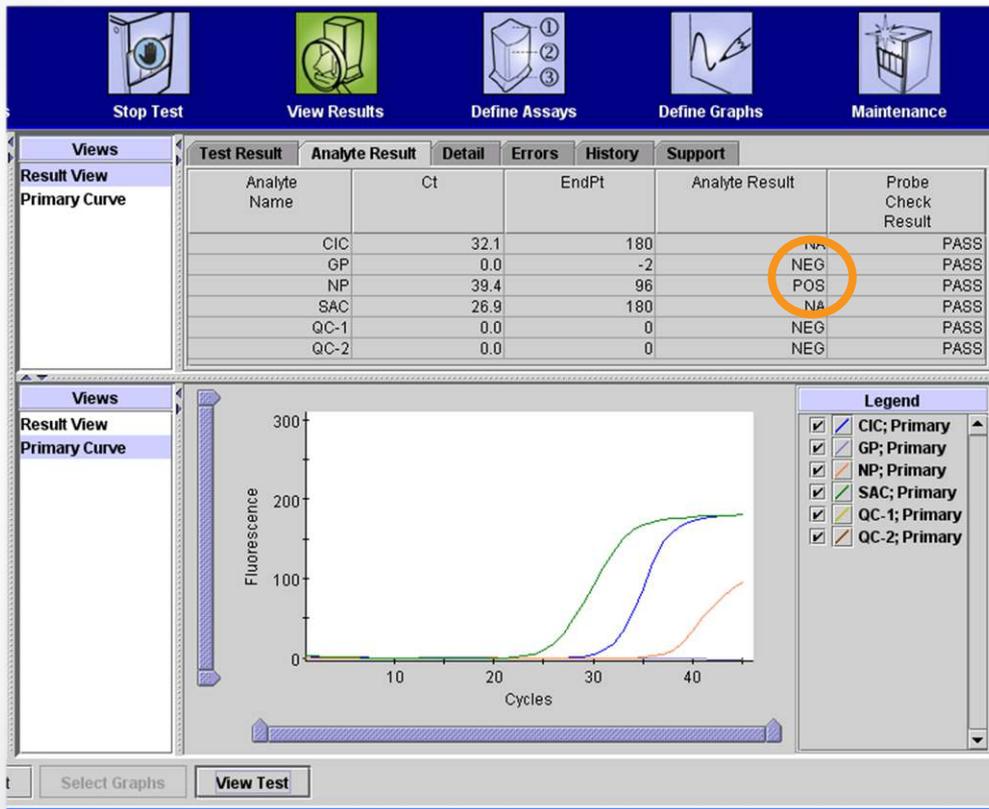


- A GP alvo do Ébola foi detetada e o valor de CT situa-se dentro do intervalo válido
- SAC: NA (não aplicável)
  - O SAC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- CIC: NA (não aplicável)
  - O CIC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- Verificação da sonda: APROVADO

# GP do Ébola NÃO DETETADA; NP do Ébola DETETADA (Ebola GP NOT DETECTED; Ebola NP DETECTED)

Test Result

Ebola GP NOT DETECTED;  
Ebola NP DETECTED

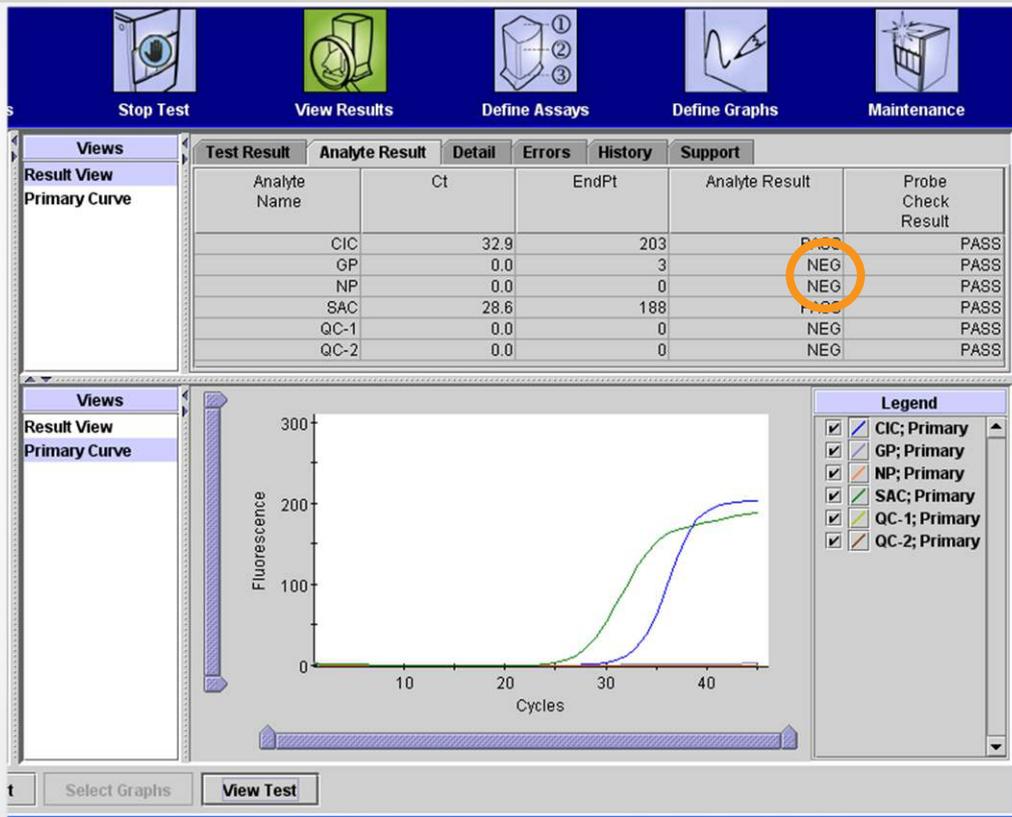


- A NP alvo do Ébola foi detetada e o valor de CT situa-se dentro do intervalo válido
- SAC: NA (não aplicável)
  - O SAC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- CIC: NA (não aplicável)
  - O CIC é ignorado devido à ocorrência da amplificação do alvo de ÉBOLA
- Verificação da sonda: APROVADO

# GP do Ébola NÃO DETETADA; NP do Ébola NÃO DETETADA (Ebola GP NOT DETECTED; Ebola NP NOT DETECTED)

Test Result

Ebola GP NOT DETECTED;  
Ebola NP NOT DETECTED



- Os alvos GP e NP do ÉBOLA NÃO foram detetados
- SAC: APROVADO
  - O SAC tem um valor de Ct dentro do intervalo válido
- CIC: APROVADO
  - O CIC tem um valor de Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO

# Resolução de problemas

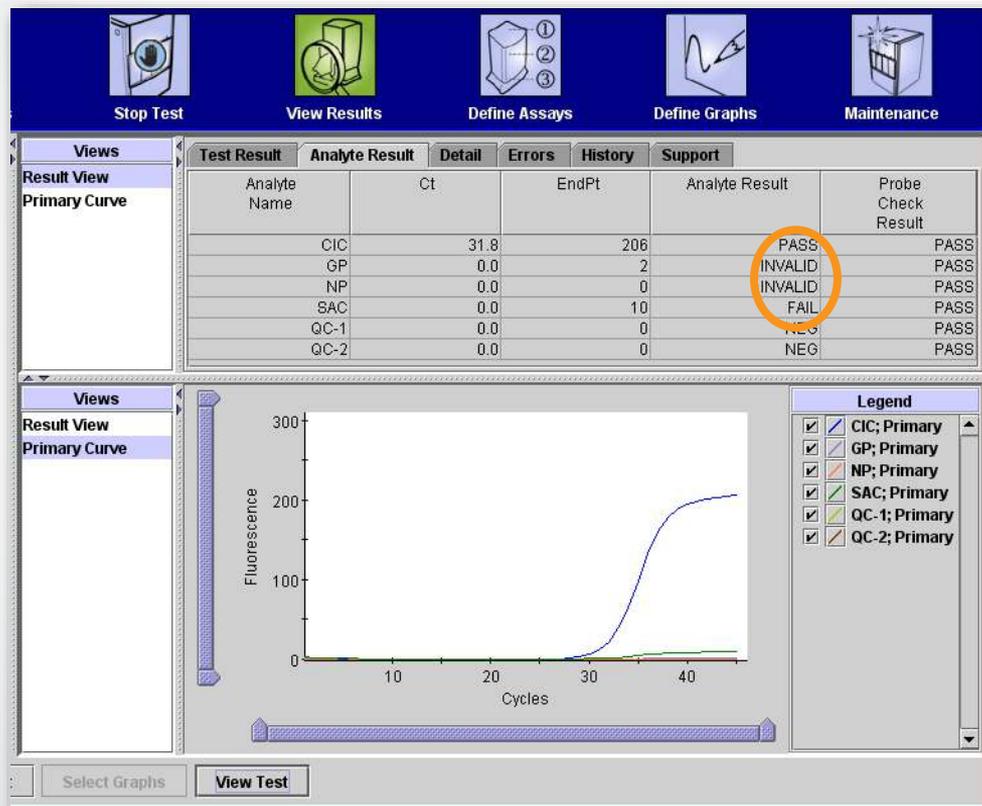


# Fatores que afetam negativamente os resultados

- Colheita incorreta da amostra
  - A carga viral na amostra é inferior ao limite de detecção do teste
  - Não foi avaliado o desempenho com outros tipos de amostra
- Transporte ou conservação incorretos da amostra colhida
  - As condições de transporte e conservação são específicas para cada amostra
  - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento correto
- Procedimento de análise incorreto
  - A modificação dos procedimentos de análise pode alterar o desempenho do teste
  - Para se evitarem resultados erróneos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções do folheto informativo

# Resultado INVÁLIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**



- Não foi possível determinar a presença ou ausência dos alvos GP e NP do Ébola.
- SAC: FALHOU (FAIL); o sinal não tem um Ct dentro do intervalo válido e/ou um parâmetro de avaliação inferior ao mínimo definido
- Verificação da sonda — APROVADO (Probe Check — PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

## Causas possíveis

- Colheita ou preparação inadequadas da amostra
- Presença de substâncias interferentes na amostra

## Solução

- Repetir o teste com um cartucho novo

# ERRO (ERROR)

ERROR



A presença ou ausência dos alvos NP ou GP não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com o Procedimento de repetição do teste nas instruções de utilização.

GP/NP: SEM RESULTADO (NO RESULT)

SAC: SEM RESULTADO (NO RESULT)

Verificação da sonda: FALHOU (FAIL); um ou todos os resultados de verificação da sonda falharam

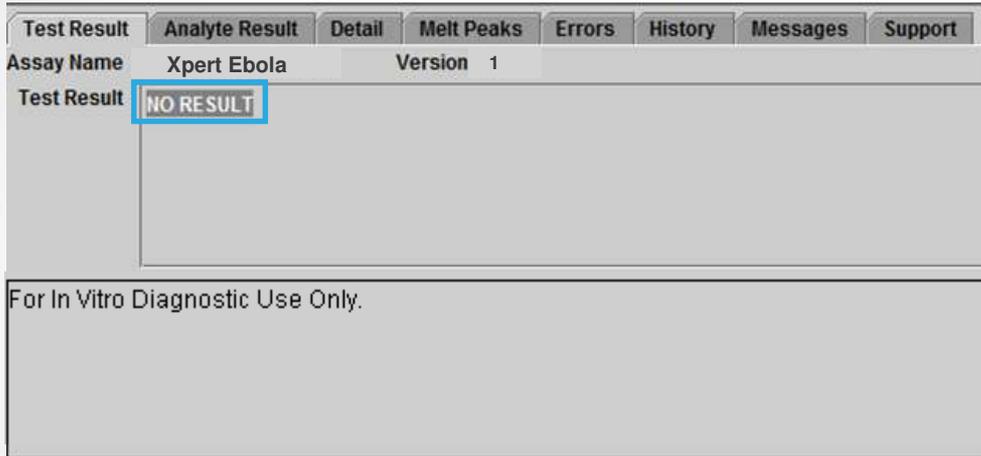
Se a verificação da sonda foi aprovada, o erro foi causado porque o limite máximo da pressão excedeu o intervalo aceitável ou porque houve falha de um componente do sistema.

## Solução

Repetir o teste com um cartucho novo.

# SEM RESULTADO (NO RESULT)

NO RESULT



Test Result Analyte Result Detail Melt Peaks Errors History Messages Support

Assay Name Xpert Ebola Version 1

Test Result **NO RESULT**

For In Vitro Diagnostic Use Only.

## Causas possíveis

SEM RESULTADO (NO RESULT) indica que os dados recolhidos foram insuficientes.

- O teste foi interrompido com o botão Parar teste (Stop test)
- Falha elétrica

## Solução

- Assegurar a alimentação
- Repetir o teste com um cartucho novo.

Não é possível determinar a presença ou ausência de GP/NP.

**SEM RESULTADO (NO RESULT)** indica

que os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.

GP/NP: SEM RESULTADO

(NO RESULT)

SAC: SEM RESULTADO (NO RESULT)

Verificação da sonda: NA (não aplicável)

# Procedimento de repetição do teste

1



Elimine o cartucho usado

*Siga as orientações de segurança da sua instituição para a eliminação dos cartuchos*

2



Obtenha a amostra residual, misture de acordo com o folheto informativo

*Se o volume da amostra que sobrou for insuficiente ou a repetição do teste continuar a apresentar um resultado INVÁLIDO (INVALID), ERRO (ERROR) ou SEM RESULTADO (NO RESULT), recolha uma amostra nova*

3



Obtenha um cartucho novo

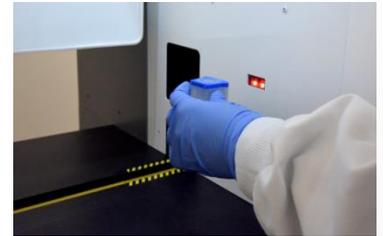
Rotule apropriadamente como repetição do teste o novo cartucho

Processe a amostra de acordo com o folheto informativo

4



Execute o teste no sistema



# Assistência técnica

- Antes de contactar a Assistência Técnica da Cepheid, reúna as seguintes informações:
  - Nome do produto
  - Número de lote
  - Número de série do sistema
  - Mensagens de erro (se houver alguma)
  - Versão do software e, caso se aplique, número da etiqueta de serviço (Service Tag) do computador
- Registe a sua reclamação online através da hiperligação seguinte <http://www.cephaid.com/us/support> :  
*Criar um caso de assistência (Create a Support Case)*

Obrigado.



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

