

# Formazione sul saggio: Formazione su Xpert<sup>®</sup> FII & FV

*Formazione tecnica solo per i  
prodotti US-IVD e CE-IVD*



# Programma di formazione

- Formazione su Xpert FII & FV
  - Utilità clinica
  - Conservazione e manipolazione dei kit
  - Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni di analisi
  - Preparazione della cartuccia
  - Bersagli del saggio
  - Analisi dei risultati
  - Controllo qualità
  - Discussione, domande e risposte



# Obiettivi del programma di formazione

Al termine della formazione, gli operatori saranno in grado di:

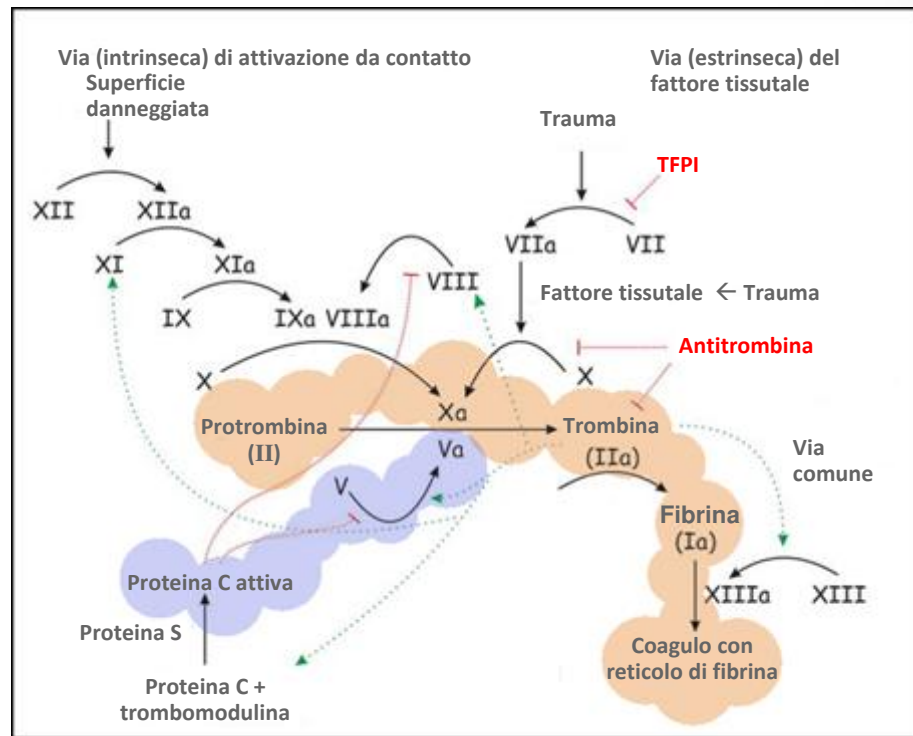
- Conservare e utilizzare i materiali per Xpert FII & FV.
- Seguire le corrette precauzioni di sicurezza del laboratorio.
- Prelevare i campioni di analisi del tipo giusto e trasportarli.
- Predisporre la cartuccia ed eseguire il saggio.
- Refertare i vari risultati generati dal software.
- Smaltire i materiali utilizzati.

# Fattore II e fattore V di Leiden



# Che cosa sono le mutazioni del fattore II e del fattore V di Leiden?

- Le mutazioni del fattore II (G20210A) e del fattore V di Leiden (G1691A) sono associate a un maggiore rischio di trombosi venosa.
- Tali mutazioni sono presenti rispettivamente nel 2% e 5% della popolazione generale.
- **Mutazione del fattore II o della protrombina (G20210A)**
  - Transizione da G ad A in posizione nucleotidica 20210 nella regione 3' non traslata del gene
  - Associata ad un aumento dei livelli plasmatici di protrombina
- **Mutazione del fattore V di Leiden (G1691A)**
  - Transizione da G ad A in posizione nucleotidica 1691 sul gene codificante per il fattore V
  - Che determina la sostituzione dell'amminoacido arginina con la glutammina nella proteina fattore V,
  - Con conseguente resistenza al taglio da parte della proteina C attivata (APC).



# Genotipi

	Normale	Eterozigote	Omozigote (mutante)
Fattore II	GG	GA	AA
Fattore V	GG	GA	AA



# La soluzione Cepheid



- Rilevamento simultaneo
  - Alleli mutanti e normali per fattore II e fattore V
- Un controllo interno per ogni singolo campione
  - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
- Risultati in circa 30 minuti
- Semplice e facile da utilizzare
  - Sistema a cartuccia autonomo
- Risultati on-demand 24 ore al giorno, 7 giorni su 7
- Accesso casuale

# Uso previsto

Il saggio Xpert® Factor II & Factor V è un **test diagnostico qualitativo di genotipizzazione *in vitro*** per il rilevamento degli alleli del fattore II e del fattore V da sangue intero anticoagulato con sodio citrato o EDTA.

Il saggio viene eseguito sul sistema Cepheid GeneXpert® Dx con versione del software 4.0 o superiore.

Questo test è previsto per fornire risultati sulle mutazioni del fattore II (G20210A) e del fattore V di Leiden (G1691A) a sostegno della diagnosi in individui con sospetta trombofilia.



# Requisiti dei sistemi e dei reagenti

## Sistemi GeneXpert

- Moduli a 6 colori
- Software GXDX v4.0 o software Xpertise v4.0 o versioni successive

## Kit per i test

- GXFIIFV-10

## Prelievo dei campioni

- Sangue intero in provetta di prelievo con EDTA o citrato di sodio

## Materiali necessari ma non forniti

- Pipetta per la dispensazione di 50  $\mu$ L di sangue anticoagulato con sodio citrato o EDTA, dotata di puntali con filtro resistente agli aerosol.
- Candeggina
- Etanolo al 70% o etanolo denaturato al 70%

# Componenti del kit Xpert FII & FV

Test eseguibili con ciascun kit	10
CD del kit	File di definizione del saggio (Assay Definition Files, ADF)
	Istruzioni per l'importazione del saggio
	Foglietto illustrativo
Conservazione	da 2 °C a 28 °C



Il reagente di lisi contiene tiocianato di guanidinio (H302, H316, H320, H402, EUH031), che è dannoso se ingerito, causa leggera irritazione della pelle, provoca irritazione degli occhi, è pericoloso per gli organismi acquatici e a contatto con gli acidi sprigiona gas tossici.

# Trasporto e conservazione dei campioni di analisi Xpert FII & FV

Campione di analisi	Temperatura di trasporto e conservazione (°C)	Durata della conservazione
Sangue intero in EDTA oppure Sangue intero in provette con anticoagulante sodio citrato	2-8 °C	15 giorni
	22-28 °C (Temperatura ambiente)	24 ore
	-20 °C o -80 °C	3 mesi



- Far scongelare il sangue completamente fino a quando non raggiunge la temperatura ambiente.
- Si consiglia di non congelare/scongelare il sangue più di una volta.

# Buona prassi di laboratorio

## Predisposizione del laboratorio per la PCR

- Preparazione di cartucce e reagenti → Aggiunta del campione → Rilevamento

## Conservazione di campioni di analisi e reagenti

- Conservare i campioni di analisi separatamente rispetto ai reagenti per prevenire la contaminazione di questi ultimi.

## Apparecchiatura

- Usare puntali per pipette con filtro, quando necessario.
- Seguire i consigli del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature di laboratorio.
- Eseguire la manutenzione ordinaria dello strumento GeneXpert.

# Buona prassi di laboratorio - Segue

## Pulizia

- Pulire le superfici di lavoro con candeggina per uso domestico\* diluita in acqua 1:10, seguita da una soluzione di etanolo al 70%. Asciugare le superfici di lavoro con un panno.

## Personale

- Indossare camice da laboratorio e guanti puliti.
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento.

## Area del banco di laboratorio

- Pulire regolarmente l'area del banco di laboratorio.
- Tenere priva di polvere l'area sul retro degli strumenti.

\* La concentrazione finale di cloro attivo deve essere dello 0,5%, indipendentemente dalla concentrazione della candeggina per uso domestico presente nel Paese di utilizzo.

# Conservazione e manipolazione dei kit per il saggio Xpert FII & FV

- Conservare i kit per i test a 2-28 °C. Non utilizzare cartucce scadute.
- Ciascuna cartuccia monouso serve per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Non aprire la cartuccia fino a quando non si è pronti per utilizzarla.
  - Iniziare il test entro 15 minuti dall'introduzione del campione nella cartuccia.
- Evitare la contaminazione crociata durante i passaggi di manipolazione dei campioni.
  - Cambiarsi i guanti se si bagnano o vengono a contatto con i campioni di analisi.
  - Cambiarsi i guanti prima di lasciare l'area di lavoro e quando vi si entra.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta o sia stata agitata dopo avervi aggiunto il campione. Se la cartuccia viene agitata o cade dopo l'apertura del coperchio, si possono ottenere risultati non validi.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.



# Preparazione della cartuccia Xpert FII & FV

## Preparazione della cartuccia Xpert® Factor II & Factor V

Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni, fare riferimento al foglietto illustrativo.

Per una copia della scheda dati di sicurezza (SDS), visitare il sito [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o [www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

Assistenza Tecnica di Cepheid  
Ufficio USA  
+1 (888) 838-3222, opzione 2  
[techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

Ufficio europeo  
+33 563 82 53 19  
[support@cepheid.com](mailto:support@cepheid.com)



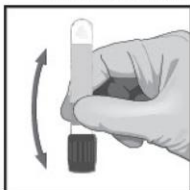
1 Procurarsi la provetta di prelievo del campione con EDTA o citrato di sodio.



2 Procurarsi una cartuccia Xpert Factor II & Factor V.



3 Miscelare delicatamente il campione, capovolgendo la provetta per almeno 5 volte fino ad ottenere un contenuto omogeneo.



4 Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.



5 Utilizzando una pipetta volumetrica con puntale resistente agli aerosol, aspirare 50 µL di campione.



6 Trasferire il campione sulla parete inferiore della camera "S" della cartuccia.

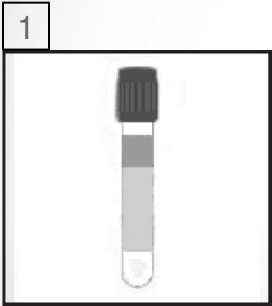


7 Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.

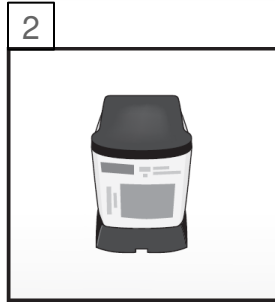


8 Caricare la cartuccia e avviare il saggio.

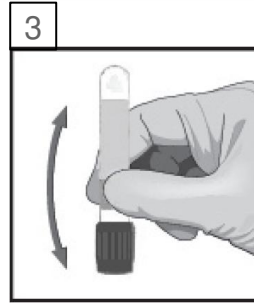
# Preparazione della cartuccia FII & FV



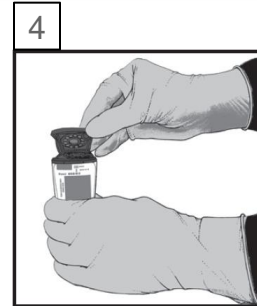
1  
Procurarsi la provetta di prelievo del campione con EDTA o citrato di sodio.



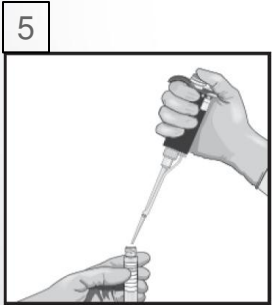
2  
Procurarsi una cartuccia Xpert Factor II & Factor V.



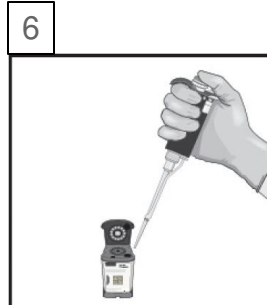
3  
Miscelare delicatamente il campione, capovolgendo la provetta per almeno 5 volte fino ad ottenere un contenuto omogeneo.



4  
Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.



5  
Utilizzando una pipetta volumetrica con un puntale resistente agli aerosol, aspirare 50 µL di campione.



6  
Trasferire il campione sulla parete inferiore della camera "S" della cartuccia.



7  
Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.



8  
Dare inizio al test entro l'arco di tempo specificato nel foglietto illustrativo.

# Refertazione combinatoria — Xpert FII & FV ADF

- La funzione combinatoria del software GX v4.0 o versione successiva consente all'operatore di selezionare una delle tre opzioni di refertazione del saggio:
  - “Xpert FII”, “Xpert FV” o “Xpert FII & FV Combo”

Patient ID 12345  
Sample ID 12345

Name	Version
Xpert FV	1
Xpert FII	1
Xpert FII & FV Combo	1

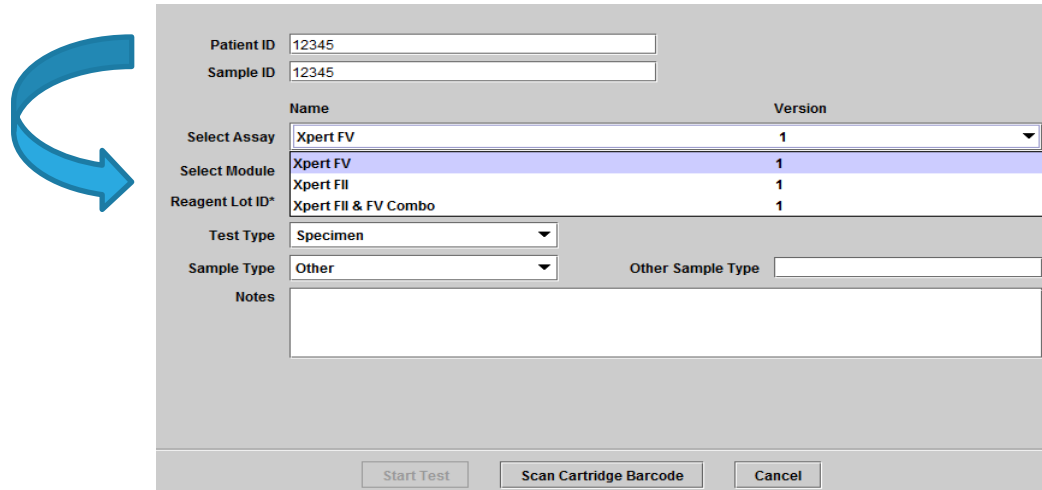
Select Assay Xpert FV  
Select Module Xpert FV  
Reagent Lot ID\* Xpert FII & FV Combo

Test Type Specimen  
Sample Type Other Other Sample Type  
Notes

Start Test Scan Cartridge Barcode Cancel

# Refertazione combinatoria — Xpert FII & FV ADF

- Scegliere il test desiderato dal menu a discesa “Seleziona saggio” (Select Assay)



Patient ID 12345  
Sample ID 12345

Name	Version
Xpert FV	1
Xpert FV	1
Xpert FII	1
Xpert FII & FV Combo	1

Select Assay: Xpert FV  
Select Module: Xpert FV  
Reagent Lot ID\*: Xpert FII & FV Combo  
Test Type: Specimen  
Sample Type: Other  
Other Sample Type:   
Notes:

Start Test   Scan Cartridge Barcode   Cancel

- Una volta avviato il test, saranno raccolti solo i risultati relativi al saggio selezionato in questo passaggio.
  - Esempio: se l’operatore seleziona l’opzione “Xpert FII”, una volta avviato il saggio non potrà più cambiare l’opzione per raccogliere dati FII e FV.

# Fasi automatizzate del test Xpert FII & FV



# Controllo qualità

*Per maggiori dettagli,  
consultare il foglietto illustrativo*





# Strategia di controllo del saggio Cepheid

- 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.
    - Controllo del sistema di strumentazione – Verifica stato
    - Controllo endogeno
    - Controllo dei reagenti – Verifica della sonda

# Controllo del sistema di strumentazione – Verifica stato

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

# Controllo per la verifica della sonda – PCC

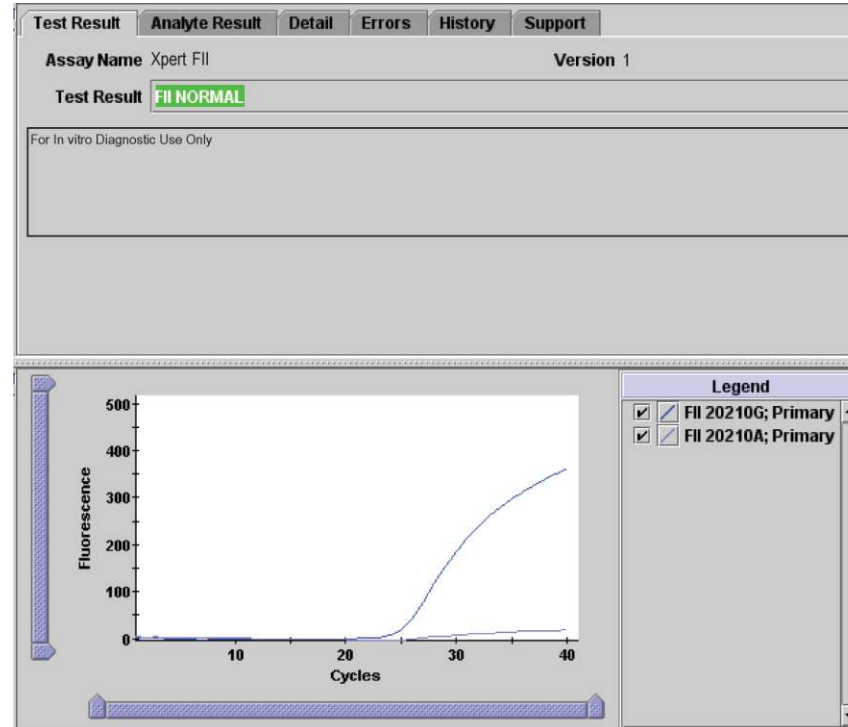
- Prima che inizi la reazione di PCR, il sistema misura il segnale di fluorescenza emesso dalla sonda, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsfere, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità della sonda e la stabilità dei coloranti.
- I valori rilevati vengono confrontati con le impostazioni predefinite stabilite da Cepheid.
- La verifica della sonda serve a individuare:
  - assenza di microsfere di reagente specifico per la sequenza bersaglio (Target Specific Reagent, TSR) e/o di reagente enzimatico, che contengono tutti i primer, le sonde e il template del controllo interno
  - ricostituzione incompleta dei reagenti
  - riempimento incompleto della provetta di reazione
  - degradazione della sonda
- Il PCC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- Se la verifica della sonda viene respinta, il sistema segnalerà un risultato ERRORE (ERROR).

# Analisi dei risultati

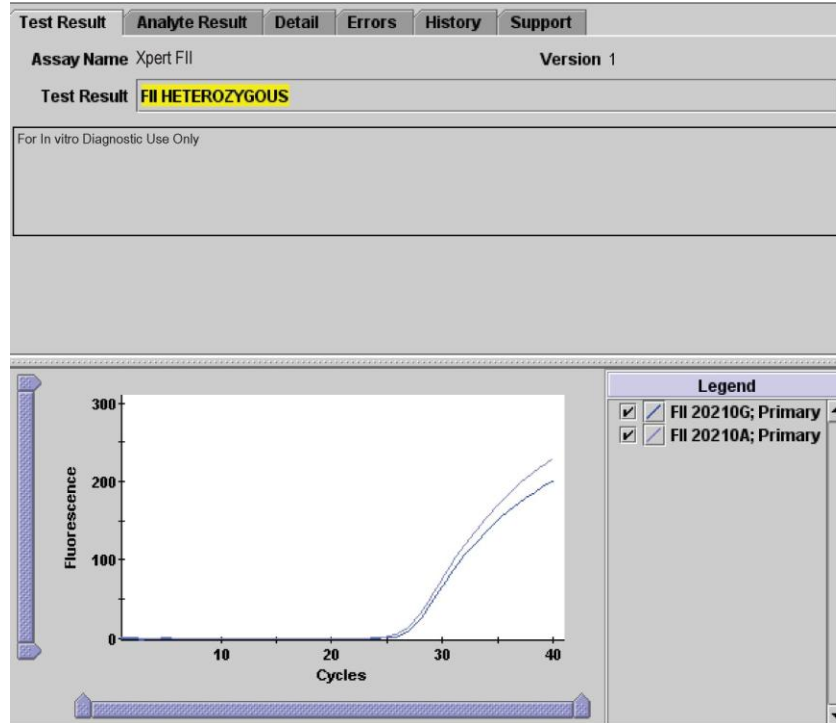
*Per maggiori dettagli,  
consultare il foglietto illustrativo*



# Risultato normale Xpert FII

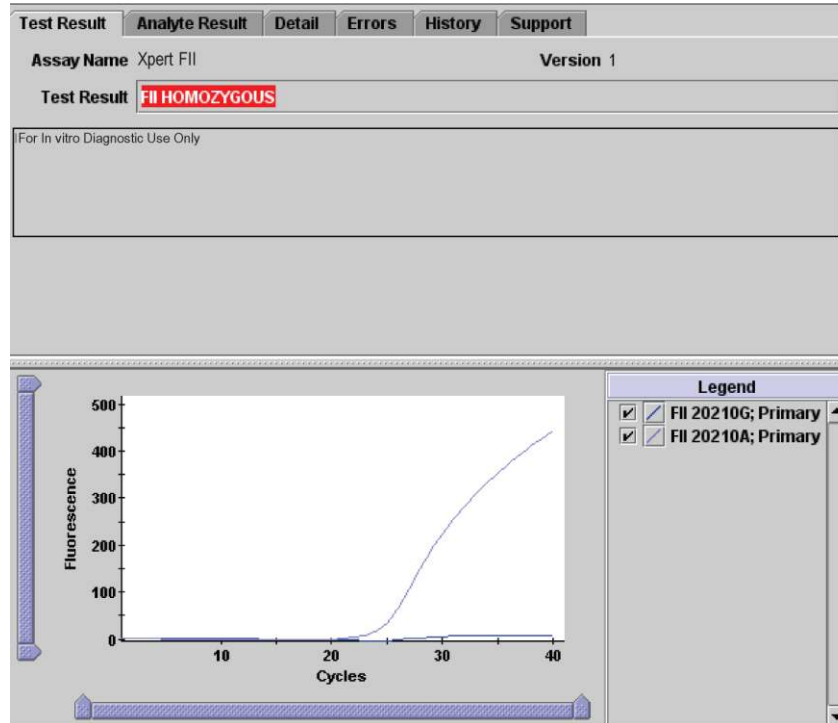


# Risultato eterozigote Xpert FII

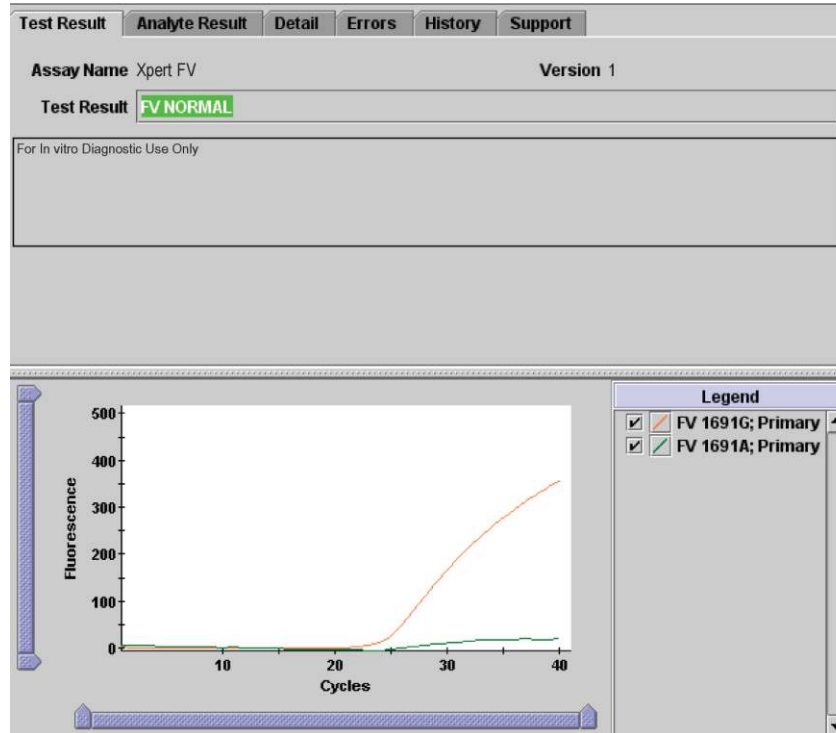




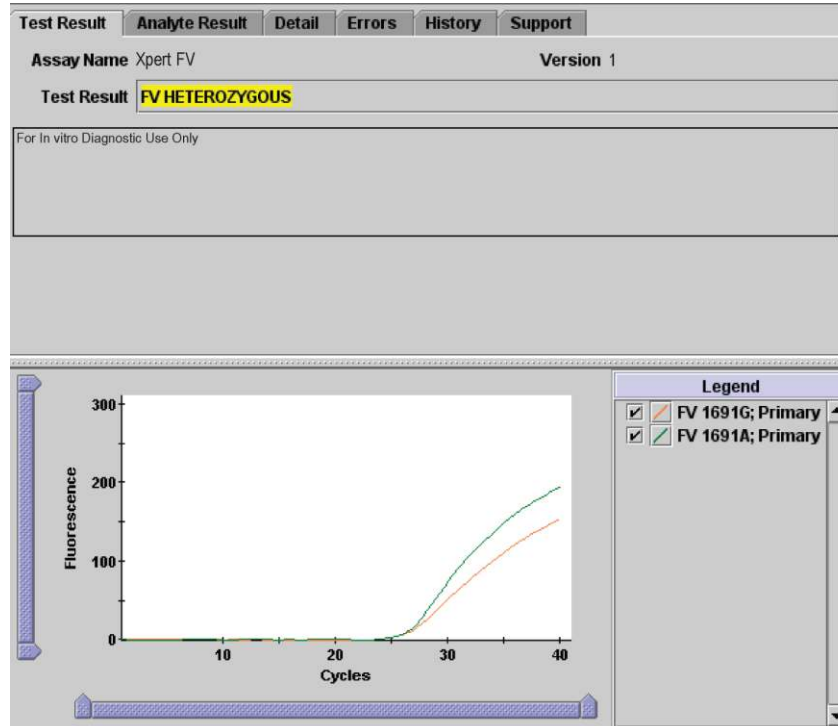
# Risultato omozigote Xpert FII



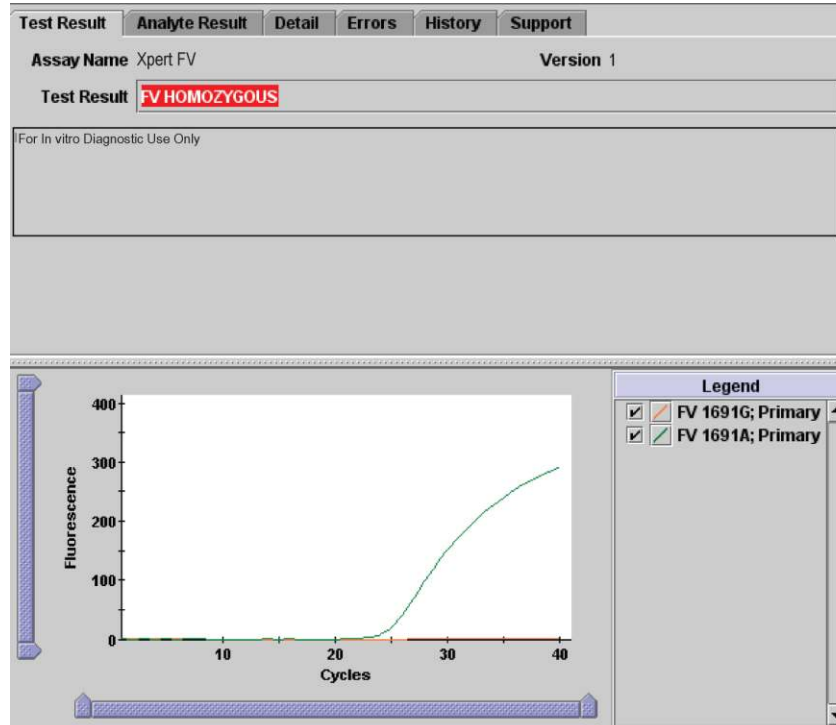
# Risultato normale Xpert FV



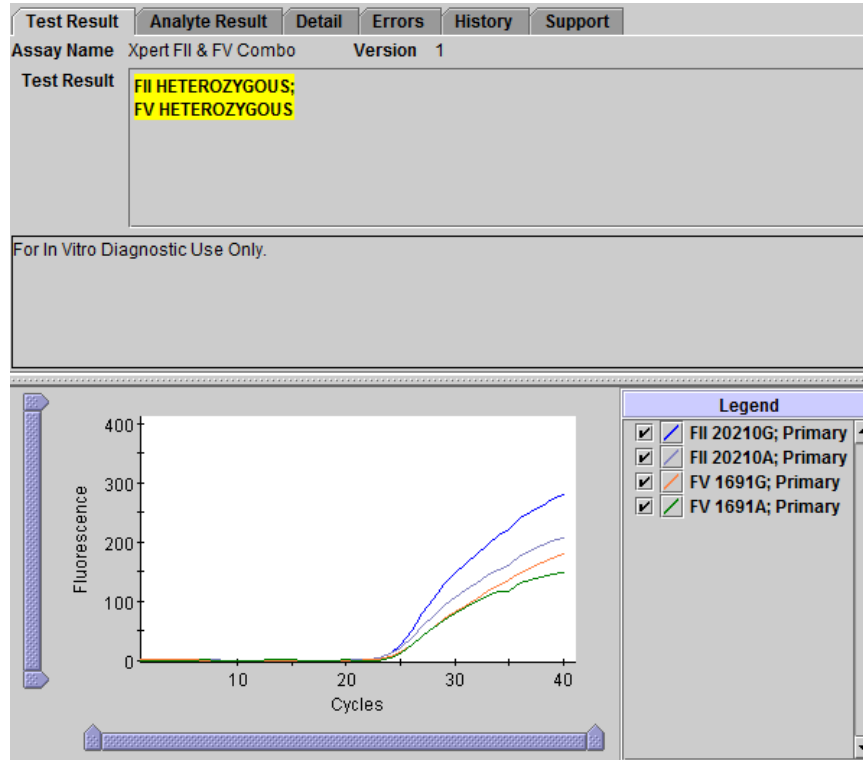
# Risultato eterozigote Xpert FV



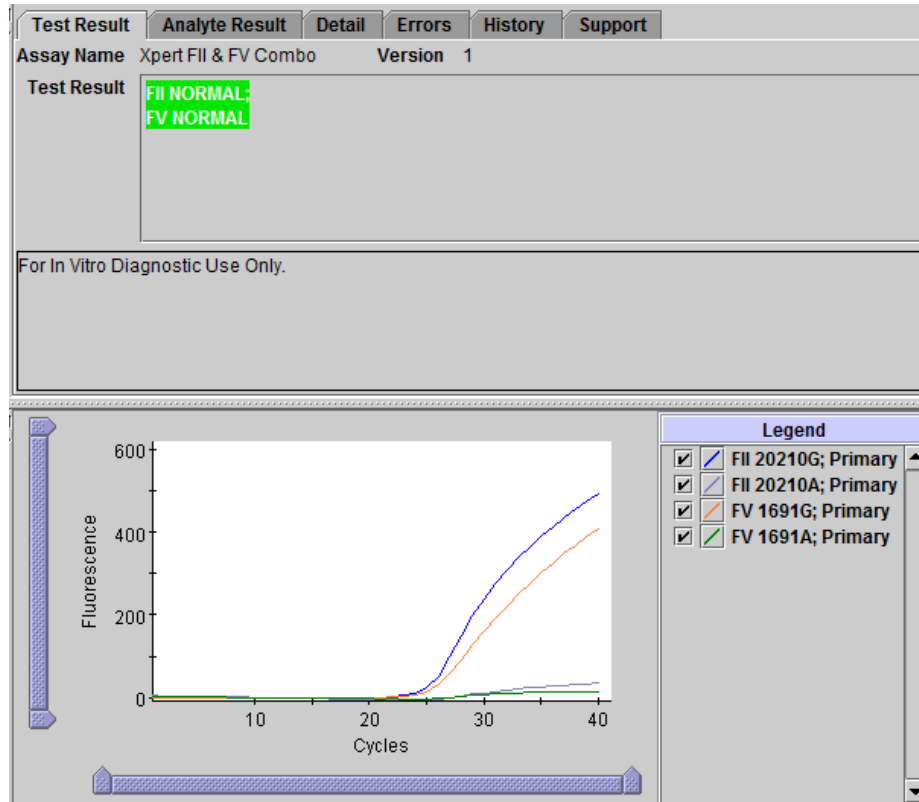
# Risultato omozigote Xpert FV



# Risultato eterozigote Xpert FII & FV Combo

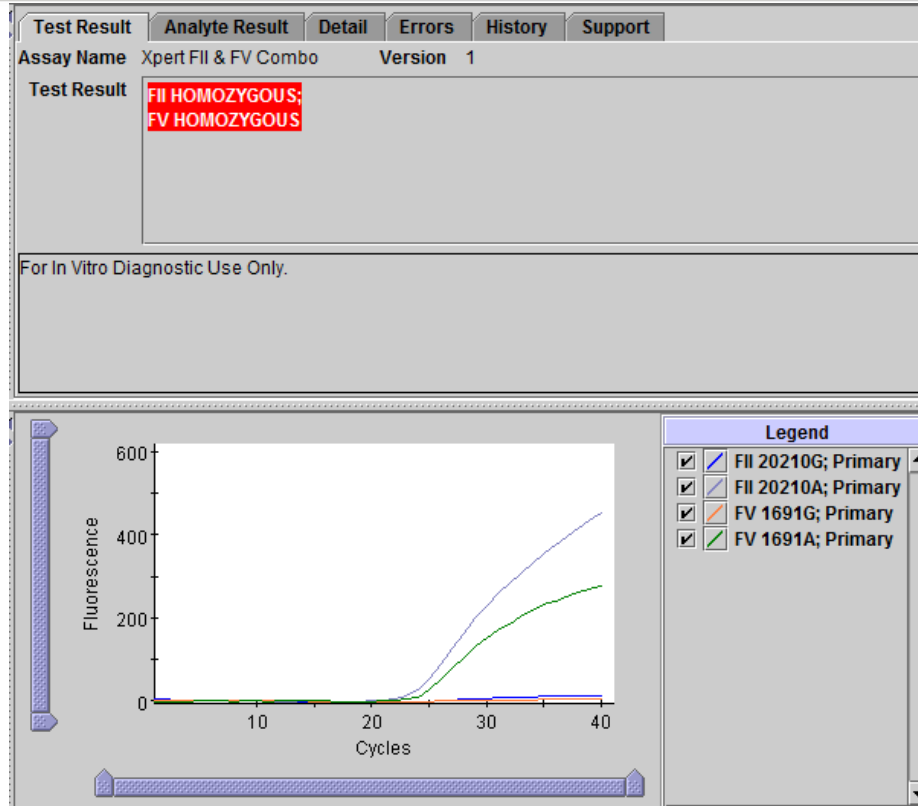


# Risultati normali Xpert FII & FV Combo





# Risultati omozigoti Xpert FII & FV Combo



# Motivi per ripetere il saggio

- Un risultato NON VALIDO (INVALID) indica che l'SPC interno è stato respinto. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.
- Il risultato ERRORE (ERROR) indica che il saggio è stato interrotto. Cause probabili: riempimento non corretto della provetta di reazione, rilevamento di un problema di integrità con la sonda del reagente; superamento del limite massimo di pressione; guasto di un componente del sistema.
- NESSUN RISULTATO (NO RESULT) indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto l'esecuzione di un test in corso o si è verificato un errore di caricamento, il software è stato chiuso prematuramente o si è verificata un'interruzione di corrente.

# NON VALIDO (INVALID)

Test Result

INVALID

La presenza o l'assenza degli alleli del fattore II/fattore V normali e mutanti non può essere determinata.

- Verifica della sonda – RIUSCITO (Probe Check - PASS): tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
- NON VALIDO (INVALID) - La presenza o l'assenza degli alleli del fattore II/fattore V normali e mutanti non può essere determinata.
  - L'amplificazione non è avvenuta
  - Nel test combinatorio esiste una o nessuna curva, il risultato non è valido
  - In rare mutazioni del fattore V (A1696G, G1689A e A1692C)

# ERRORE (ERROR)

Test Result

ERROR

La presenza o l'assenza degli alleli del fattore II/fattore V normali e mutanti non può essere determinata.

- ERRORE (ERROR)
- Verifica della sonda — RESPINTA\* (Probe Check — FAIL); uno o più risultati della verifica della sonda sono stati respinti.
  - Il controllo per la verifica della sonda è stato respinto e il saggio è stato interrotto, probabilmente perché è stato rilevato il riempimento inadeguato di una provetta di reazione.
  - Rilevato un problema di integrità della sonda.
  - Gli errori possono essere causati anche dal superamento dei limiti massimi di pressione
  - Guasto di un componente del sistema.

\* Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.

# NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

Test Result

NO RESULT

La presenza o l'assenza degli alleli del fattore II/fattore V normali e mutanti non può essere determinata.

- NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
- Verifica della sonda (Probe Check) – NA (non applicabile)
- La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del saggio (l'operatore, ad esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test).

# Procedura di ripetizione del test Xpert FII & FV

1



Gettare la cartuccia usata.

*Seguire le linee guida di sicurezza del proprio istituto per lo smaltimento delle cartucce.*

2



Procurarsi il campione residuo.

*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.

Etichettare correttamente come “ripetizione del test” sulla nuova cartuccia.

Trattare il campione come indicato nel foglietto illustrativo.

4



Eeguire il test sul sistema.



# Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- I campioni di sangue provenienti da pazienti in eparinoterapia ed emotrasfusi possono interferire con i risultati della PCR e comportare risultati non validi o erronei.
- L'errata conservazione dei campioni prelevati può influenzare il risultato
  - Assicurarsi che il campione sia ben miscelato e che non sia stato sottoposto a molti cicli di scongelamento/congelamento.
  - Verificare che alla camera di campionamento sia stato aggiunto il volume di sangue corretto
- Non è stata osservata alcuna inibizione nel caso di campioni di sangue intero sottoposti a un ciclo di congelamento/scongelamento (sangue emolizzato).
- Non è stata osservata alcuna significatività statistica tra campioni di analisi equivalenti trattati con EDTA o sodio citrato.

# Assistenza Tecnica

- Cepheid fornisce assistenza tecnica sul campo, telefonicamente, via fax e per e-mail.
- Le informazioni per contattare gli uffici Cepheid sono disponibili all'indirizzo <http://www.cepheid.com/support>
  - Selezionare l'opzione Contattaci (Contact Us) per accedere alle informazioni di contatto
  - Compilare il modulo online per creare una richiesta di assistenza
- Prima di contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:
  - Nome del prodotto
  - Numero di lotto
  - Numero di serie dello strumento
  - Messaggi di errore (se presenti)
  - Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer





Grazie.

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