Formazione sul saggio Xpert® HPV

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

Centro di formazione Cepheid





Programma di formazione

Xpert HPV

- Utilità clinica
- Reagenti
- Prelievo dei campioni
- 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® HPV e i kit per il prelievo dei campioni
- Seguire le adeguate precauzioni di sicurezza del laboratorio
- Prelevare i campioni di analisi del tipo giusto e trasportarli
- Predisporre la cartuccia ed eseguire il saggio
- Comprendere la strategia di controllo del saggio
- Refertare i vari risultati generati dal software



La soluzione Cepheid



- Rilevamento simultaneo
 - Tipi di HPV ad alto rischio
- Controlli a bordo per ogni singolo campione
 - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
 - Controllo dell'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC)
 - Risultati in circa 60 minuti
- Sistema a cartuccia autonomo per ridurre al minimo il rischio di contaminazione
- Risultati on-demand 24 ore al giorno, 7 giorni su 7
- Accesso casuale



Uso previsto

E6/E7 del genoma del DNA virale da 14 tipi di papilloma virus umano (Human Papillomavirus, HPV) ad alto rischio in una sola analisi. Xpert HPV consente di identificare in modo specifico i tipi HPV 16 e HPV 18/45 in due canali di rilevamento distinti e di riportare gli altri 11 tipi ad alto rischio (31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) in un unico risultato combinato (pooling).

Campione di analisi

 Cellule cervicali prelevate in soluzione PreservCyt®

Sono stati convalidati per l'utilizzo del saggio Xpert HPV anche campioni di analisi pretrattati con acido acetico glaciale (GAA).

Rilevamento di HPV 16 e HPV 18/45 e 11 altri tipi ad alto rischio

Tipi di HPV rilevati		
HPV 16	HPV 16	
HPV 18_45	HPV {18 e 45}	
P3	HPV {31, 35, 33, 52, 58}	
P4	HPV {51, 59}	
P5	HPV {39, 68, 56, 66}	



Campioni di analisi, sequenze bersaglio e sonde

Campione di analisi

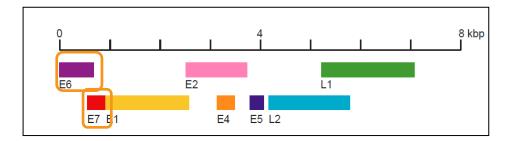
- Cellule cervicali prelevate in soluzione PreservCyt®
- Sono stati convalidati per l'utilizzo del saggio Xpert HPV anche campioni di analisi pretrattati con acido acetico glaciale (GAA).

Sequenza bersaglio

Tipi di HPV ad alto rischio

Sonde

- 1 sonda si lega al SAC
- Le restanti sonde si legano a seconda del tipo di HPV ad alto rischio presente nel campione





Requisiti del saggio

Sistemi GeneXpert

- Moduli a 6 colori
- •Software GeneXpert v4.3a o successiva / Software Infinity v6.1 o successiva

Kit per i test (CE-IVD)

•GXHPV-CE-10

Prelievo dei campioni

- •Kit di prelievo dei campioni: Soluzione PreservCyt (Hologic Corp.) #PRESERVCYT50
- Spazzolino endocervicale #CERVEXBRUSH25

Altri materiali

- Dispositivi di protezione individuale (DPI)
- Candeggina
- Etanolo al 70% o etanolo denaturato al 70%
- Vortex

Facoltativo

- •Dispositivo di protezione da sovraccarichi di tensione/UPS (gruppo di continuità)
- Stampante



Avvertenze e precauzioni

Predisposizione del laboratorio per la PCR

Conservazione di campioni di analisi e reagenti

- Preparazione di cartucce e reagenti
 → Aggiunta del campione → Rilevamento
- Conservare i campioni di analisi separatamente rispetto ai reagenti per prevenire la contaminazione di questi ultimi

Apparecchiatura

- Seguire i consigli del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature di laboratorio
- Eseguire la manutenzione ordinaria dello strumento GeneXpert (Sezione 9 del Manuale dell'operatore)

Per informazioni più complete sul sistema GeneXpert, fare riferimento al Manuale dell'operatore GeneXpert.



Buona prassi di laboratorio

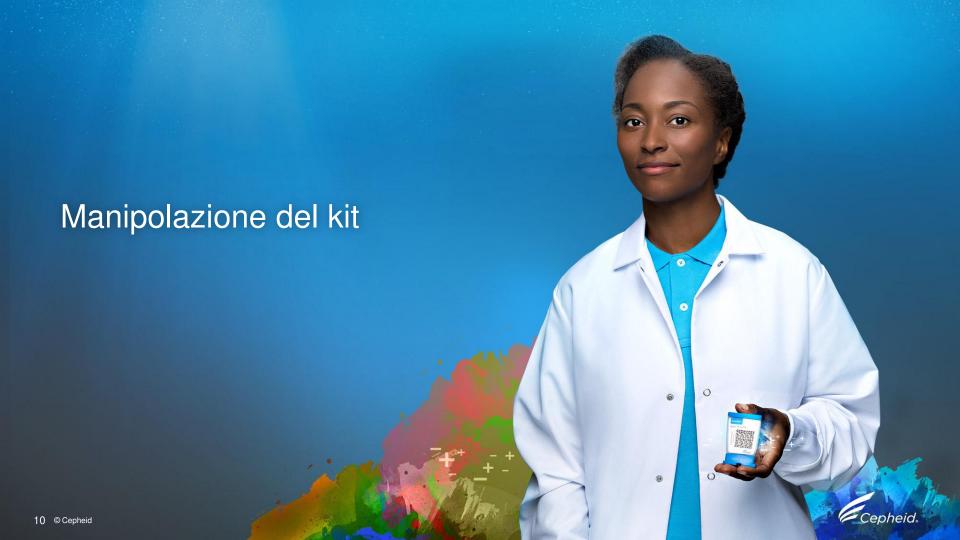
Pulizia

Personale

Area del banco di laboratorio

- Pulire le superfici di lavoro con candeggina per uso domestico* diluita in acqua a una concentrazione finale di 1:10, seguita da una soluzione di etanolo al 70%. Asciugare le superfici di lavoro con un panno
- In caso di contaminazione, pulire a fondo l'area contaminata con candeggina per uso domestico diluita in acqua 1:10 o perossido di idrogeno al 3% (p/v) e sciacquare bene con acqua. Asciugare le superfici di lavoro con un panno
- Indossare sempre i dispositivi di protezione individuale (DPI) adeguati, secondo necessità
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento
- Pulire regolarmente l'area del banco di laboratorio
- Tenere priva di polvere l'area sul retro degli strumenti





Contenuto del kit Xpert HPV

Numero di catalogo	GXHPV-CE-10	
Test eseguibili con ciascun kit	10	
Contenuto della cartuccia	Microsfere di reagente	
	Reagente liquido*	
	Reagente di lavaggio	
	Reagente legante	
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	
Conservazione	2 °C-28 °C	



Le cartucce contengono sostanze chimiche pericolose. Per ulteriori informazioni, vedere il Foglietto illustrativo e la Scheda dati di sicurezza.



Avvertenze e precauzioni





- 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 test Xpert HPV soltanto quando si aggiunge il campione, chiudere il coperchio e procedere al successivo.
- Con il sistema GeneXpert , iniziare il test entro 30 minuti dall'aggiunta del campione nella cartuccia.
- Con il sistema Infinity, porre la cartuccia sul dispositivo trasportatore entro 30 minuti dall'aggiunta del campione.



Avvertenze e precauzioni

- Non agitare la cartuccia.
- Non usare una cartuccia se...



- sembra danneggiata
- è caduta dopo essere stata estratta dalla confezione
- è caduta o è stata agitata dopo avervi aggiunto il 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





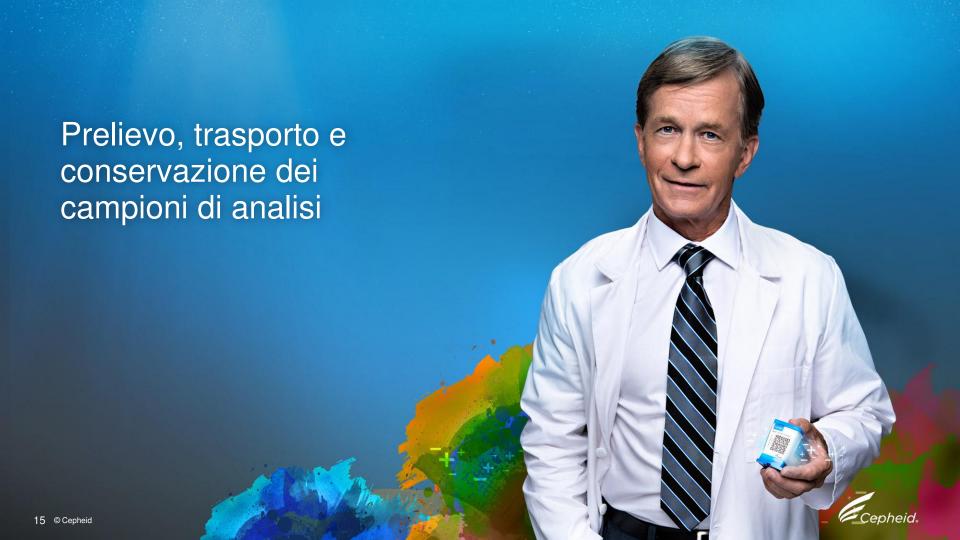




Limitazioni del saggio Xpert HPV

- Il saggio Xpert HPV è stato convalidato esclusivamente per l'uso con campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt tramite spazzolino o tramite spatola associata a spazzolino endocervicale.
- L'interferenza del saggio può essere osservata in presenza di sangue intero, cellule mononucleate del sangue periferico, *Candida albicans* o crema vaginale densa.
- Gli effetti di altre potenziali variabili quali perdite vaginali, uso di assorbenti interni, di lavande vaginali e variabili legate al prelievo dei campioni non sono stati determinati.
- Le prestazioni del saggio Xpert HPV non sono state valutate per i soggetti vaccinati contro l'HPV.

Cepheid.



Prelievo dei campioni Xpert HPV

Tipo di campioni:

campioni cervicali in soluzione PreservCyt®



Prelievo dei campioni:

- attenersi alle istruzioni del produttore per il prelievo di campioni cervicali tramite spazzolino O tramite spazzolino/spatola con testine rimovibili
 - http://www.thinprep.com
 - http://www.thinprep.com/hcp/specimen collection/broom like device.html







Trasporto e conservazione dei campioni di analisi

Prima di eseguire il test		Temperatura (°C)	Durata della conservazione
This Prop I	Campioni cervicali prelevati in soluzioni PreservCyt	+30 °C	Fino a 6 mesi

Spedire i campioni cervicali prelevati in soluzioni PreservCyt a temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C II trasporto dei campioni di analisi per la ricerca dell'HPV deve essere conforme alle normative nazionali





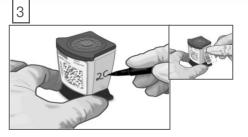
Preparazione della cartuccia Xpert HPV



Procurarsi un campione cervicale per la ricerca dell'HPV prelevato in soluzione PreservCyt



Prendere una cartuccia Xpert HPV e la pipetta di trasferimento fornita in dotazione



Applicare sul lato della cartuccia un'etichetta con ID uguale a quello del campione



Aprire il coperchio della cartuccia



Capovolgere delicatamente la provetta di trasporto 8-10 volte per miscelare Oppure miscelare con un miscelatore vortex a velocità media per 5 s



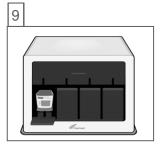
Pipettare almeno 1 mL di campione utilizzando la pipetta in dotazione*



Svuotare lentamente la pipetta nella camera per il campione della cartuccia



Chiudere bene il coperchio



Avviare il test sullo strumento GeneXpert entro il tempo consigliato



*Saggio HPV Pipetta di trasferimento



Esecuzione di un test

Creare il test (Create Test)

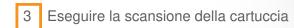
GeneXpert



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)

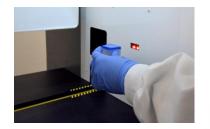




GeneXpert Infinity

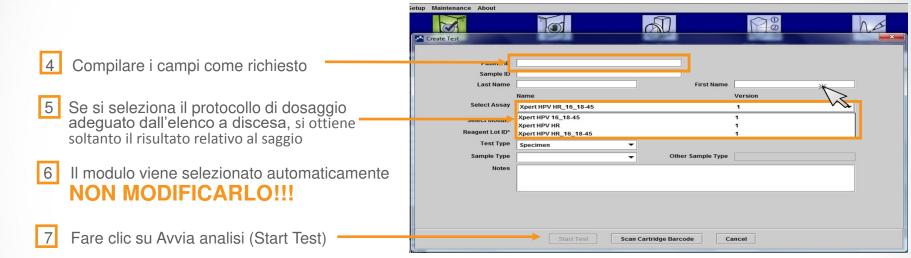








Creare un test



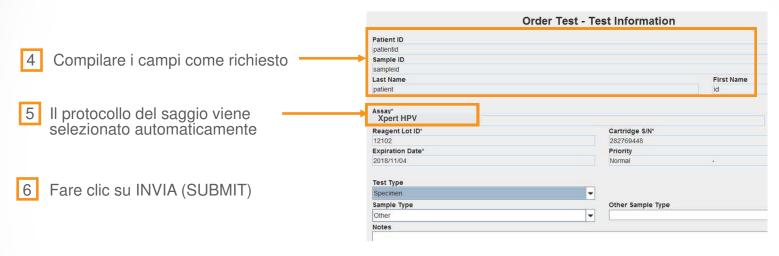
8 Una spia verde lampeggerà sul modulo
Caricare la cartuccia nel modulo e chiudere lo sportello

Una volta avviato il test, e se è stato richiesto soltanto un saggio, è impossibile ottenere il risultato dell'altro saggio



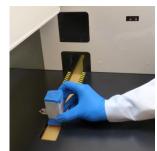


Per creare un test su Xpertise Dx Software





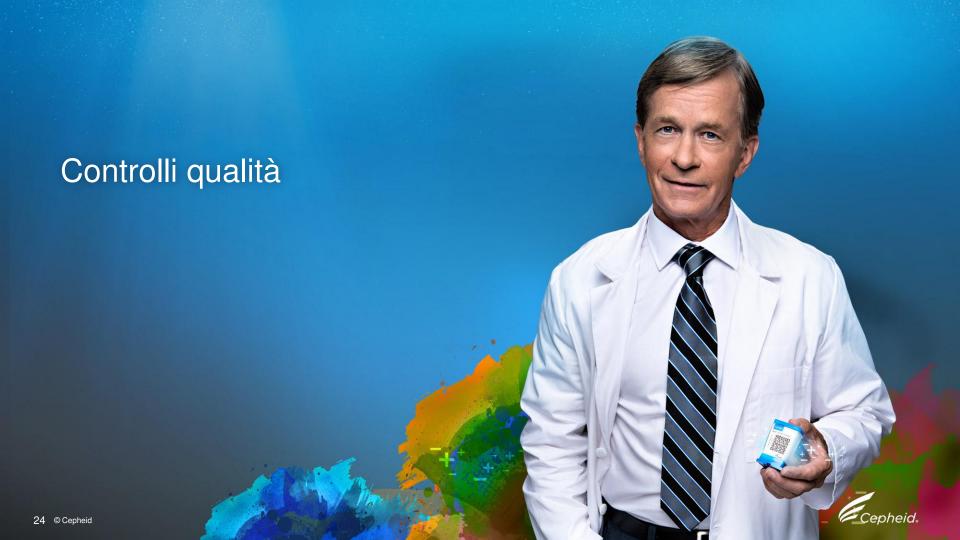
7 Posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore





Protocollo automatizzato Xpert





Strategia di controllo di Cepheid



Controllo del sistema – Verifica 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 di 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
 - Controllo dell'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC)
 - Controlli per la verifica della sonda (PCC)



Controlli di qualità interni



Controlli per la verifica della sonda (PCC)

- Prima della fase di PCR, il segnale di fluorescenza viene misurato su tutte le sonde e confrontato con le impostazioni predefinite di fabbrica per monitorare
 - reidratazione delle microsfere

- integrità della sonda
- riempimento della provetta di reazione
 stabilità del colorante

Controllo dell'adequatezza dei campioni dei campioni – SAC

- HMBS (Idrossimetilbilano sintasi)
 - Garantisce che nella camera per il campione della cartuccia siano state aggiunte cellule umane
 - Se negativo può indicare un prelievo o una miscelazione del campione insufficienti
 - Deve essere positivo in un campione negativo
 - Può essere positivo o negativo in un campione positivo



Controlli esterni disponibili in commercio

AcroMetrix® http://www.lifetechnologies.com/acrometrix

Codice prodotto	Descrizione	Configurazione	Conservazione
950075	Positivo per HPV 16	5 x 4 mL/scatola	2 °C-8 °C
950076	Positivo per HPV 18	5 x 4 mL/scatola	2 °C-8 °C
950078	Negativo per HPV	5 x 4 mL/scatola	2 °C-8 °C

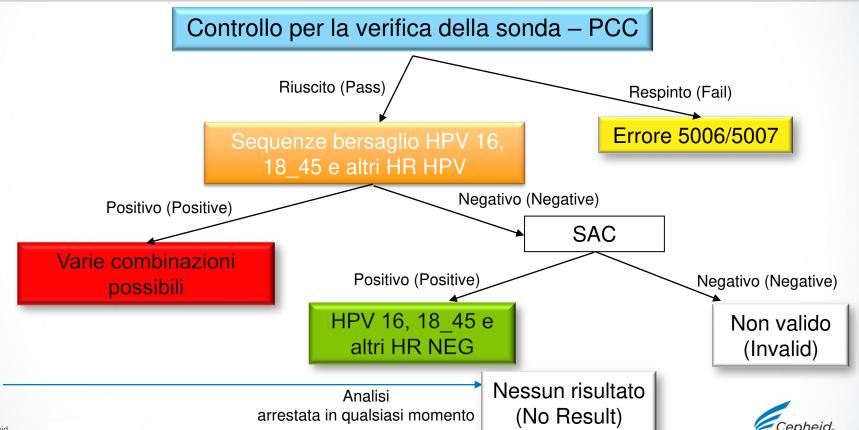
- 1. Prendere 1 flaconcino di materiale di controllo e miscelare delicatamente in modo da garantire una sospensione omogenea.
- 2. Usando la pipetta in dotazione, aspirare il materiale di controllo appena sopra la tacca di 1 mL.
- 3. Caricare il materiale aspirato nella camera per il campione della cartuccia Xpert HPV.
- 4. Chiudere il coperchio e avviare il test su GeneXpert.
- Per ridurre al minimo il deterioramento del materiale di controllo, subito dopo l'uso riportare i campioni inutilizzati alle condizioni di conservazione raccomandate.

- Oltre a quello indicato sopra, sono disponibili 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.





Algoritmo



Risultati

Risultati visualizzati	HPV 16	HPV 18_45	Altri HR HPV
HPV16 POS:			
HPV 18_45 NEG:	+	_	_
ALTRI HR HPV NEG	·		
HPV16 POS:			
HPV 18_45 POS:	+	+	_
ALTRI HR HPV NEG	·	·	
HPV16 NEG:			
HPV 18_45 NEG:	_	-	-
ALTRI HR HPV NEG			
HPV16 NEG:			
HPV 18_45 POS:	_	+	-
ALTRI HR HPV NEG			
HPV16 NEG:			
HPV 18_45 NEG:	_	-	+
ALTRI HR HPV POS			
HPV16 POS:			
HPV 18_45 POS:	+	+	+
ALTRI HR HPV POS			



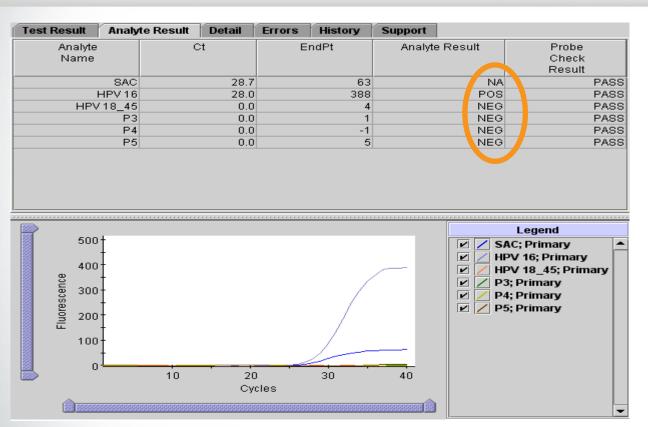
Informazioni per i docenti - Etichette delle legende

Tipi di HPV rilevati e quale curva di amplificazione li rappresenta

Curva di amplificazione	Tipi di HPV rilevati
HPV 16	HPV 16
HPV 18_45	HPV {18 e 45}
P3	HPV {31, 35, 33, 52, 58}
P4	HPV {51, 59}
P5	HPV {39, 68, 56, 66}



HPV 16 POS/ HPV 18_45 NEG/ altri HR HPV NEG





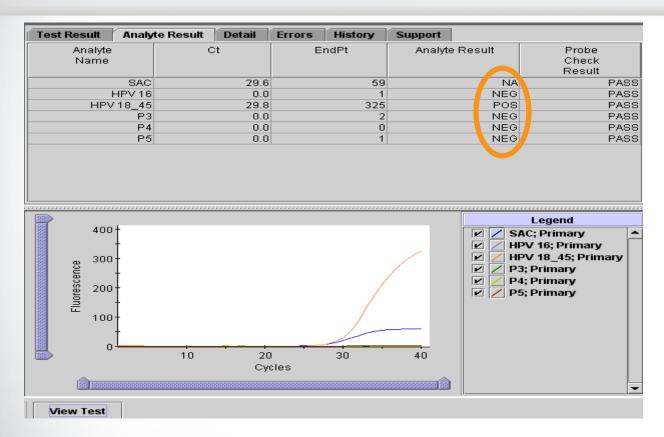
-La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV 16 ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato.

-SAC: Il SAC non è applicabile perché si è verificata l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV

-Verifica della sonda: RIUSCITO (Probe Check - PASS)



HPV 16 NEG/ HPV 18_45 POS/ altri HR HPV NEG

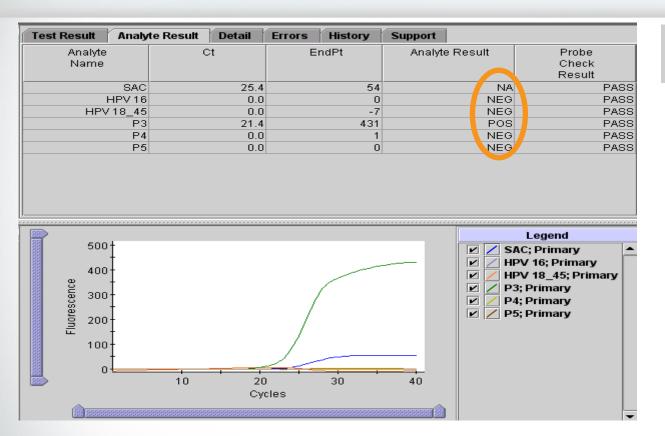




- -La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV18_45 ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato.
- -SAC: Il SAC non è applicabile perché si è verificata l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV
- -Verifica della sonda: RIUSCITO (PASS)



HPV 16 NEG/ HPV 18_45 NEG/ altri HR HPV POS





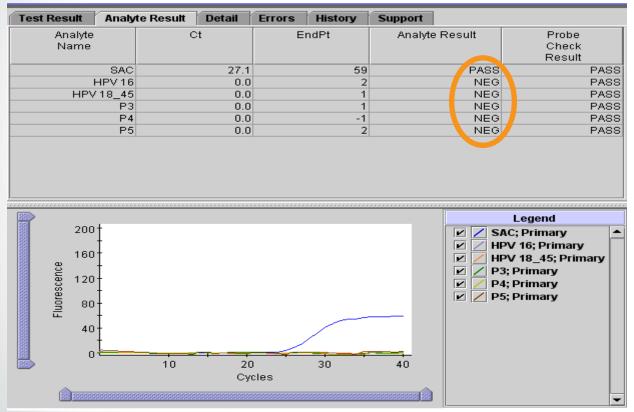
-Le sequenze bersaglio del DNA di altri HPV ad alto rischio hanno un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato.

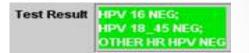
-SAC: Il SAC non è applicabile perché si è verificata l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV

-Verifica della sonda: RIUSCITO (PASS)



HPV 16 NEG/ HPV 18_45 NEG/ altri HR HPV NEG





-Le sequenze bersaglio del DNA dell'HPV hanno un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza al di sotto del valore soglia impostato.

-SAC: Il SAC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido

-Verifica della sonda: RIUSCITO (PASS)

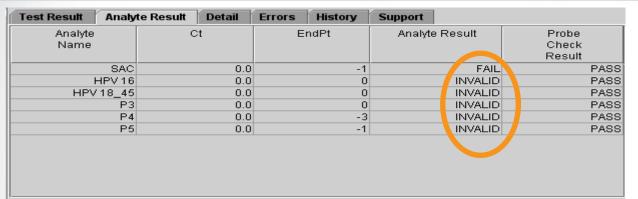


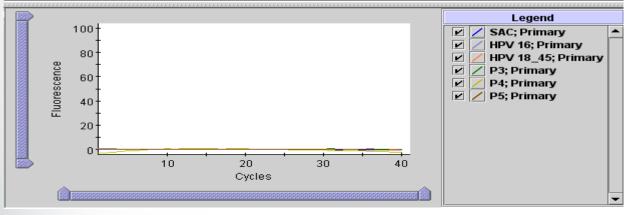


Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- 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, fare riferimento al 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 erronei.
- Sostanze interferenti
 - In presenza di sostanze interferenti si possono ottenere risultati falsi negativi o risultati non validi.

Risultato NON VALIDO (INVALID)





Test Result INVALID

- La presenza o l'assenza della sequenza bersaglio del DNA dell'HPV non può essere determinata.
- SAC: Il risultato della sequenza bersaglio per il SAC è negativo. Il SAC ha un valore Ct che non rientra nell'intervallo valido.
- Verifica della sonda: RIUSCITO (PASS)
- Causa
 - Prelievo non corretto del campione
 - Preparazione non corretta del campione
 - Conservazione non corretta delle cartucce
 - Inefficiente trattamento del campione nella cartuccia
 - Presenza di inibitori nel campione
- Soluzione
 - Ripetere il test con una nuova cartuccia e un nuovo campione

Interferenza del saggio

Sostanze potenzialmente interferenti

In totale sono state valutate 16 sostanze endogene ed esogene, a concentrazioni specifiche, che hanno dimostrato di non influenzare la specificità del saggio

Si può osservare interferenza con il saggio in presenza di:

Sostanza	Concentrazione
Vagisil crema contro il prurito	0,25% p/v
Creme dense	> 0,25% p/v
Sangue intero	0,25% v/v
Vagi-Gard gel idratante	0,5% p/v

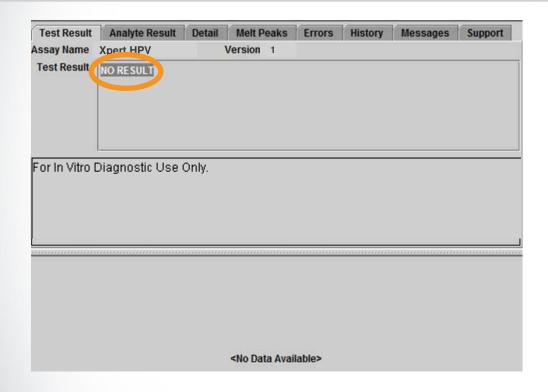
p=peso; v=volume

Per informazioni dettagliate, consultare il foglietto illustrativo corrente.



NESSUN RISULTATO (NO RESULT)





- Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'HPV
- NESSUN RISULTATO (NO RESULT) indica che i dati raccolti sono insufficienti.
- SPC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
- Verifica della sonda (Probe Check): NA (non applicabile)

Causa

- Il test è stato interrotto con il pulsante di arresto del test (Stop Test)
- Guasto elettrico

Soluzione

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



Procedura di ripetizione del test:



Gettare la cartuccia usata

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



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



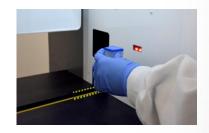
Procurarsi una nuova cartuccia

Applicare correttamente sulla nuova cartuccia un'etichetta con la dicitura "Ripetizione del test"

Trattare il campione come indicato nel foglietto illustrativo



Eseguire il test 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 (Service Tag) del computer
- Registrare il reclamo utilizzando il seguente link http://www.cepheid.com/us/support

Regione	Telefono	E-mail assistenza tecnica
USA	+1 888 838 3222	techsupport@cepheid.com
Australia e Nuova Zelanda	+ 1800 107 884 (AU) + 0800 001 028 (NZ)	techsupportANZ@cepheid.com
Brasile e America Latina	+55 11 3524 8373	latamsupport@cepheid.com
Cina	+86 021 5406 5387	techsupportchina@cepheid.com
Francia	+33 563 825 319	support@cepheideurope.com
Germania	+49 69 710 480 480	support@cepheideurope.com
India, Bangladesh, Bhutan, Nepal e Sri Lanka	+ 91 11 48353010	techsupportindia@cepheid.com
Italia	+39 800 902 567	support@cepheideurope.com
Giappone	+0120 95 4886	support@japan.cepheid.com
Sud Africa	+27 861 22 76 35	support@cepheideurope.com
Regno Unito	+44 3303 332 533	support@cepheideurope.com
Belgio e Paesi Bassi	+33 563 825 3319	support@cepheideurope.com
Altri Paesi in Europa, Medio Oriente e Africa	+33 563 825 319 +971 4 253 3218	support@cepheideurope.com



