

# Formação técnica sobre o ensaio Xpert<sup>®</sup> HIV-1 Qual

Apenas para utilização com CE-IVD

*Centro de formação da Cepheid*



# Agenda da formação

- **Xpert HIV-1 Qual**
  - Utilidade clínica
  - 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:**
  - Conservar e manusear corretamente o kit do cartucho Xpert® HIV-1 Qual e os kits de colheita de amostras
  - Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório
  - Colher os tipos de amostra corretos e transportá-los
  - Realizar a preparação do cartucho e executar o ensaio
  - Compreender a estratégia de controlo do ensaio
  - Comunicar os vários resultados gerados pelo software

# A solução Cepheid



- Deteta um alvo
  - HIV-1
- Controlos no sistema para cada amostra individual
  - Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
  - Controlo de processamento da amostra (SPC — Sample Processing Control)
  - Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)
- Resultados em cerca de 90 minutos
- O sistema de cartucho fechado minimiza o risco de contaminação
- Resultados a pedido
- Acesso aleatório

# Utilização prevista

- O ensaio Xpert HIV-1 Qual é um teste de diagnóstico **qualitativo *in vitro*** concebido para detetar ácidos nucleicos totais do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) utilizando **sangue total (ST) humano e gotas de sangue seco (GSS)** de indivíduos com suspeita de infeção por HIV-1.
- O ensaio Xpert HIV-1 Qual destina-se a ajudar a diagnosticar a infeção por HIV-1 em conjunto com o quadro clínico e outros marcadores laboratoriais.
- Este ensaio não se destina a ser utilizado como um teste de rastreio de dadores de sangue para a infeção por HIV-1.
- Este ensaio utiliza tecnologia de **reação em cadeia de polimerase/transcriptase reversa (RT-PCR)**.

# Alvos e sondas

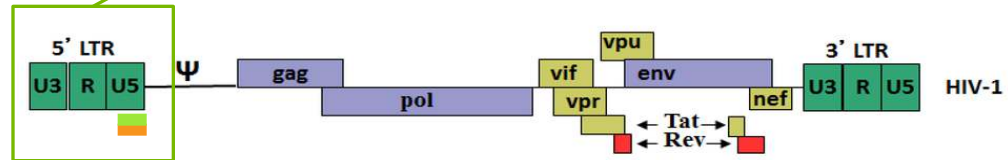
- Alvo

- HIV-1

- Sondas

- 1 sonda liga-se ao SPC

- 2 sondas ligam-se à **extremidade 3'** da **região 5'LTR** do ARN do HIV-1 (não se liga ao HIV-2)



- Dependendo do grupo do VIH, uma das sondas irá ligar-se.

# Requisitos do ensaio

## Sistemas GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **v4.7b** ou superior
- Software Infinity Dx **v6.4b** ou superior

## Kits de teste (CE-IVD)

- GXHIV-QA-CE-10

## Protocolo de colheita de amostras de sangue total

- Tubos com EDTA

## Protocolo de colheita de amostras para gotas de sangue seco

Kit de colheita GSS (*cartão de papel Whatman 903 ou equivalente*)  
Tesoura e/ou pinça estéril  
Eppendorf Thermomixer® C (*referência Eppendorf 5382 000.015*)  
Eppendorf Smartblock™ (suporte de frascos)  
(*referência Eppendorf 5309 000.007*)

## Outros materiais

- Equipamento de proteção individual (EPI)
- Lixívia a 1:10 e etanol a 70% ou etanol desnaturado

## Opcional

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

# Boas Práticas de Laboratório

## Equipamento de proteção individual (EPI)

- Usar batas e luvas limpas
- Trocar de luvas entre processamentos de amostras

## Área da bancada de laboratório

- Limpar as superfícies de trabalho a intervalos regulares com:
  - ✓ Lixívia de uso doméstico diluída 1:10
  - ✓ Solução de etanol a 70%
- Depois de limpar, certificar-se de que as superfícies de trabalhos estão secas

## Conservação de amostras e kits

- Conservar as amostras longe do kit para prevenir a contaminação

## Equipamento(s)

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



# Manuseamento do kit



# Conteúdo do kit do Xpert HIV-1 Qual

Número de catálogo	GXHIV-QA-CE-10
Testes por kit	10
Outro reagente	Reagente de amostra
CD do kit	Ficheiro de definição do ensaio (ADF — assay definition file)
	Instruções de importação do ensaio
	Folheto informativo (PDF)
Pipetas de transferência	10 (1 ml) e 10 (100 µl)
Conservação	2 °C-28 °C



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

# Conservação e manuseamento do kit Xpert HIV-1

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert HIV-1 Qual 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 do ensaio apenas para adicionar a amostra, feche a tampa e prossiga com o processamento
- Com o sistema GeneXpert, inicie o teste dentro de **30 minutos** após a adição da amostra ao cartucho
- Com o sistema Infinity, coloque o cartucho na correia transportadora dentro de **30 minutos** após a adição da amostra.



# 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



*Elimine os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert HIV-1 Qual de acordo com as orientações da instituição e nacionais relativas à eliminação de materiais perigosos*

# Limitações do Xpert HIV-1 Qual

- O desempenho do Xpert HIV-1 Qual não foi demonstrado a partir de **outras amostras** além das amostras validadas, ou seja, **sangue total e gotas de sangue seco**
- O desempenho do teste Xpert HIV-1 Qual não foi avaliado com amostras processadas por outros métodos além dos descritos no folheto informativo.
- Caso não se sigam os procedimentos do ensaio, poderão obter-se resultados falsos negativos.
- Os inibidores presentes nas amostras podem provocar resultados inválidos.

*Para obter informação detalhada, consultar o folheto informativo em vigor*

# Colheita, conservação e transporte das amostras



# Colheita de sangue total

- Colha as amostras de sangue total em tubos com EDTA, de acordo com as instruções do fabricante
- Após a colheita de sangue, misture a amostra, invertendo suavemente o tubo **10 vezes**
- É necessário um volume mínimo de **100 µl** para o teste



Tubo com EDTA



Tubo com heparina



# Colheita de gotas de sangue seco (GSS)

- Colha amostra de gotas de sangue seco (GSS)
- As GSS devem ser preparadas com cartões de papel de filtro Whatman 903, Munktell, ou equivalente, a partir de sangue obtido por:
  - punção do calcanhar
  - punção num dedo da mão
  - punção num dedo do pé
  - tubo com EDTA
- Assegure-se de que todo o círculo está coberto com sangue (aproximadamente 60 µl-70 µl). De forma a poder repetir-se o teste, é necessário preencher pelo menos dois círculos de cada amostra.
- Deixe o cartão secar ao ar, à temperatura ambiente, durante pelo menos 4 horas. Embale cada cartão num saco resselável individual que contenha uma saqueta de dessecante por saco.







<https://www.spotonsciences.com/knowledge-center/dbs-technology/>





Para obter mais detalhes sobre a preparação e acondicionamento das GSS, consulte o capítulo relacionado no *“WHO DBS drug resistance testing Manual”* (Manual de teste de farmacorresistência em GSS da OMS)



# Colheita, transporte e conservação de amostras

	Antes da realização de testes	Temperatura (°C)	Tempo de conservação
	Sangue total com anticoagulante EDTA		8 horas
			24 horas
			72 horas

Enviado para os laboratórios de teste em sacos resseláveis individuais que contenham dessecante

	Antes da realização de testes	Temperatura (°C)	Tempo de conservação
	Gotas de sangue seco (GSS)	 	12 semanas
			8 semanas

# Preparação do cartucho



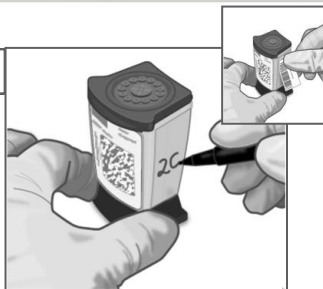
# Preparação do cartucho — sangue total

1



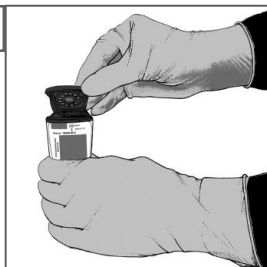
Identifique o frasco de reagente de amostra (RA) com a ID da amostra

2



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

3



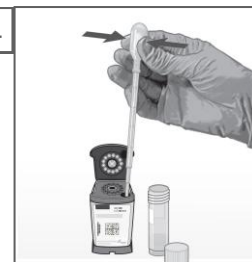
Abra a tampa do cartucho

4



4.<sup>a</sup> marca 1 ml  
3.<sup>a</sup> marca 750 µl

*\*Ensaio HIV-1 Qual  
Pipeta de transferência de 1 ml*



Transfira 750 µl do reagente de amostra para a câmara de amostra do cartucho utilizando a pipeta de transferência\* fornecida (ou uma pipeta automática)

5 x7



Misture a amostra de sangue total, invertendo o frasco, pelo menos, sete vezes



Bulbo superior

Encha até aqui 100 µl

*\*\*Ensaio HIV-1 Qual Micropipeta de transferência de 100 µl*

6



Transfira imediatamente 100 µl de sangue total para a mesma câmara de amostra, utilizando a micropipeta\*\* fornecida

7



Feche a tampa com firmeza

Inicie o teste dentro do prazo indicado no folheto informativo.

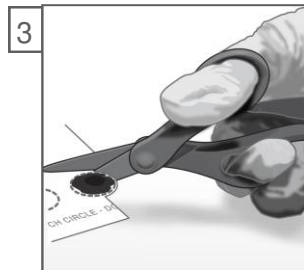
# Preparação do cartucho — gotas de sangue seco



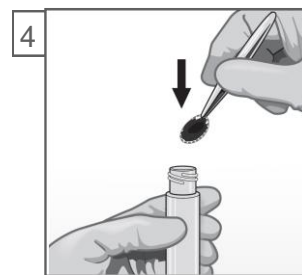
Coloque o ThermoMixer C a 56 °C



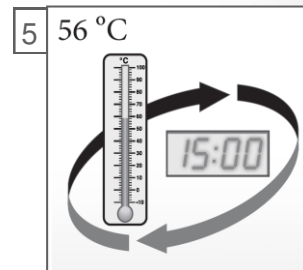
Identifique o frasco de reagente de amostra (RA) com a ID da amostra



Corte uma GSS inteira do cartão de papel de filtro para cada amostra, seguindo a linha tracejada e utilizando uma tesoura esterilizada. Se a linha tracejada for perfurada, utilize uma pinça para destacar a GSS

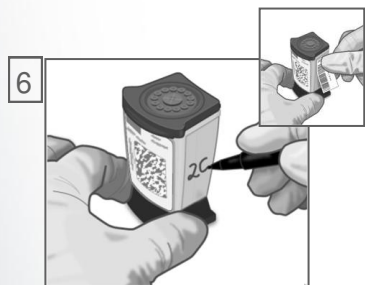


Coloque uma GSS no frasco de RA e certifique-se de que fica mergulhada no tampão



Incube este frasco no ThermoMixer C durante

- 15 minutos a
- 56 °C a 500 rpm



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

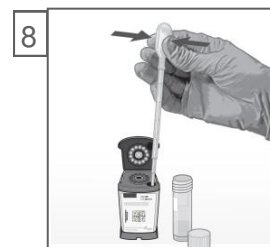


Abra a tampa do cartucho



\*Ensaio HIV-1 Qual  
Pipeta de transferência de 1 ml

Adaptado de 301-5060



Transfira todo o líquido do frasco do reagente de eluição para a câmara de amostra do cartucho, utilizando a pipeta de transferência\* fornecida (ou uma pipeta automática)



Feche a tampa com firmeza

Inicie o teste dentro do prazo indicado no folheto informativo.

# Executar um teste

## 1 Criar um teste

GeneXpert



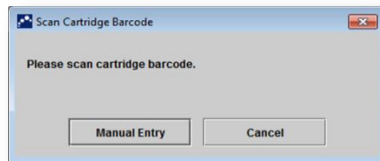
Inicie o teste dentro de **30** minutos após a adição da amostra ao cartucho

GeneXpert  
Infinity



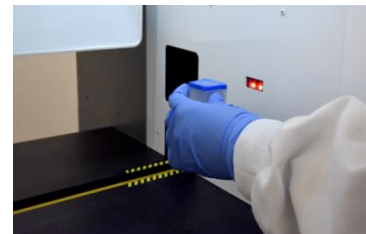
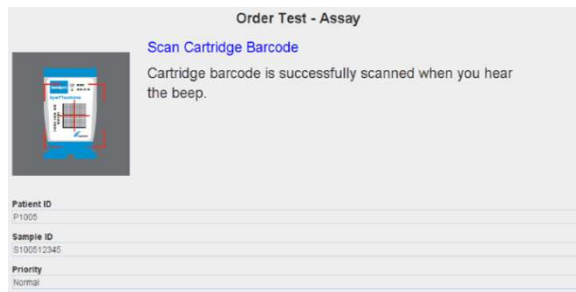
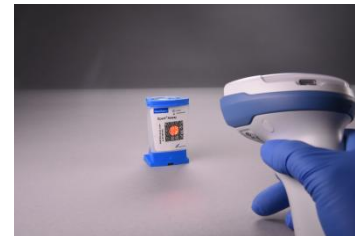
Coloque o cartucho na correia transportadora dentro de **30** minutos após a adição da amostra.

## 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, consultar 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 HIV-1 Qual

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 Barco

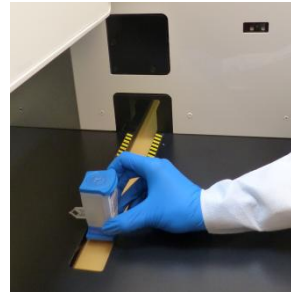


# Criar um teste no software Xpertise Dx

- 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 HIV-1 Qual	
<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 ERRO (ERROR) 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
    - Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)
    - Controlo de processamento da amostra (SPC — Sample Processing Control)
    - Controlos de verificação da sonda (PCC — Probe Check Controls)

# Controlos de qualidade internos

- **Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)**
  - Verifica que foi adicionado o volume correto de amostra ao cartucho
- **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
- **Controlos de processamento da amostra (SPC — Sample Processing Controls)**
  - Armored RNA
    - Verificam o processamento adequado da amostra
    - Verificam a lise e a presença do organismo, e detetam a inibição da PCR
    - Devem ser positivos numa amostra negativa
    - Podem ser negativos ou positivos numa amostra positiva

# Controlos externos disponíveis no mercado

**AcroMetrix®** <http://www.lifetechnologies.com/acrometrix>

Número de referência	Descrição	Configuração	Conservação
964003	Controlo de HIV-1 alto	1,2 ml x 5 frascos	≤ -20 °C
964002	Controlo de HIV-1 médio	1,2 ml x 5 frascos	≤ -20 °C
964001	Controlo de HIV-1 baixo	1,2 ml x 5 frascos	≤ -20 °C

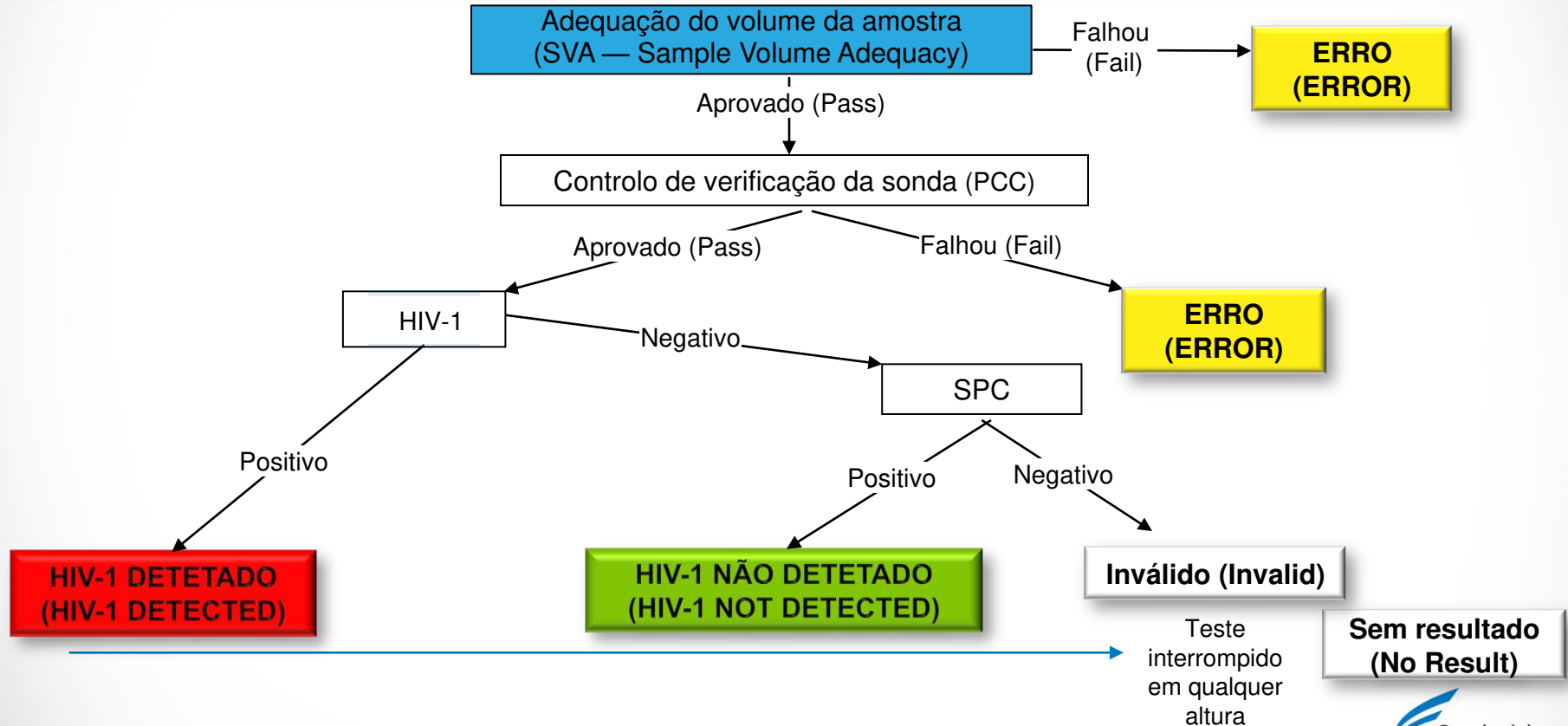
1. *Obtenha 1 frasco do material de controlo.*
2. *Descongele-o à temperatura ambiente e misture bem*
3. *Imediatamente após a descongelação, coloque o frasco em gelo*
4. *Usando a pipeta de transferência, transfira toda a amostra (1,2 ml) do kit Xpert HIV-1 e adicione-a à câmara de amostra do Xpert HIV-1 do cartucho*
5. *Feche a tampa e inicie o teste no GeneXpert*

- *Estão igualmente disponíveis muitos 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

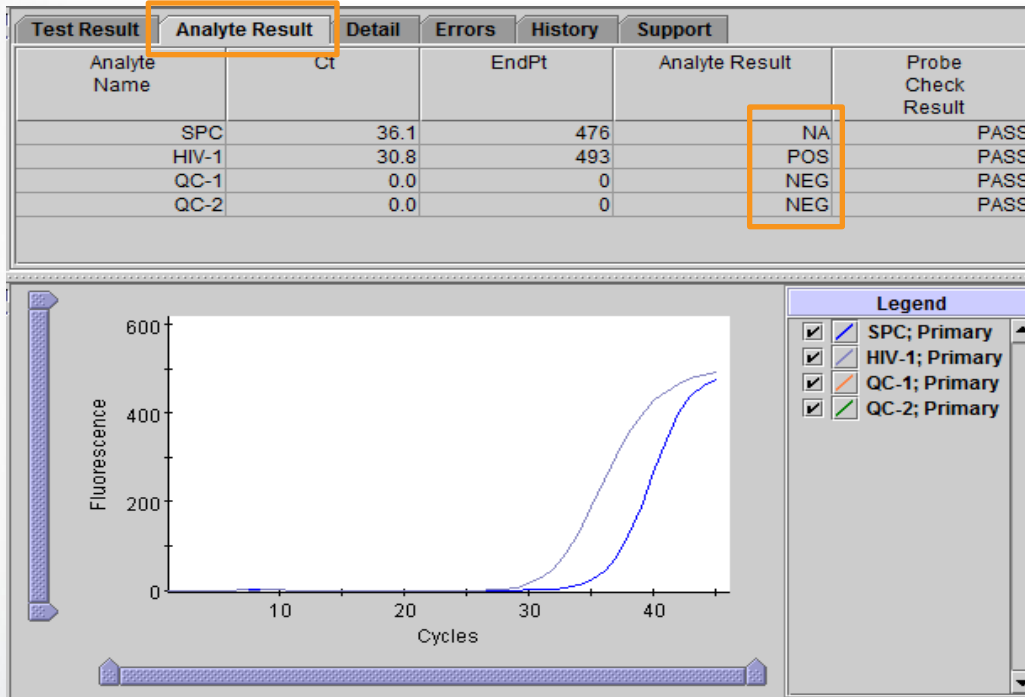


# Algoritmo de interpretação dos resultados



# HIV-1 DETETADO (HIV-1 DETECTED)

HIV-1 DETECTED

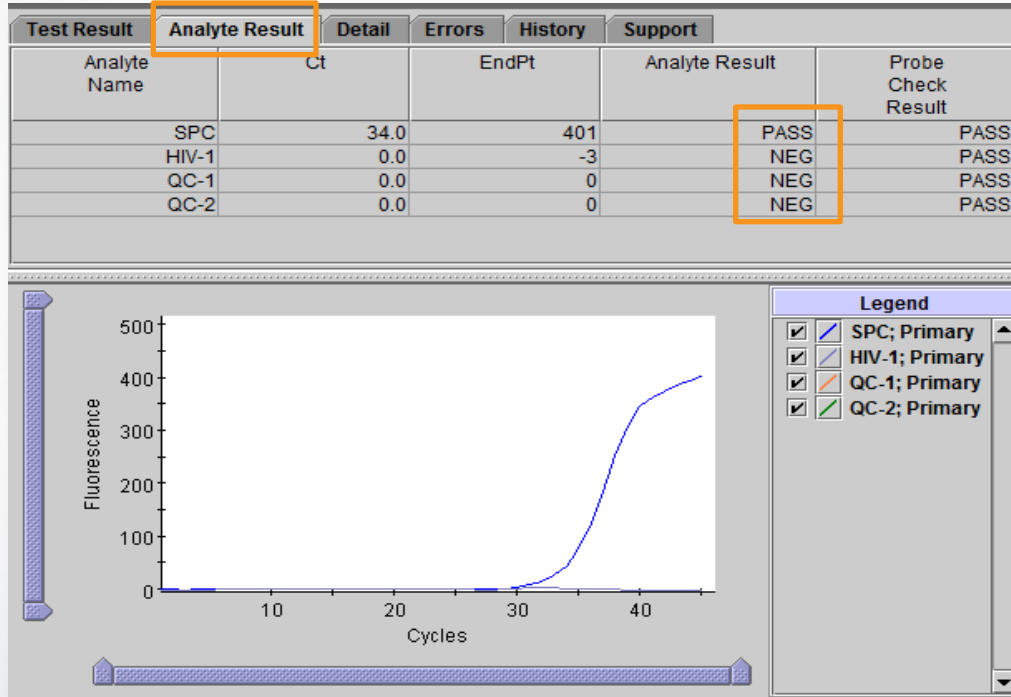


O HIV-1-alvo é detetado

- SPC: NA (não aplicável) [NA (not applicable)]; o SPC é ignorado quando o alvo HIV-1 é amplificado
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

# HIV-1 NÃO DETETADO (HIV-1 NOT DETECTED)

HIV-1 NOT DETECTED



O HIV-1-alvo NÃO é detetado

– SPC: APROVADO (PASS)

O SPC tem um valor de Ct dentro do intervalo válido

– Verificação da sonda: APROVADO (PASS)



# Resolução de problemas

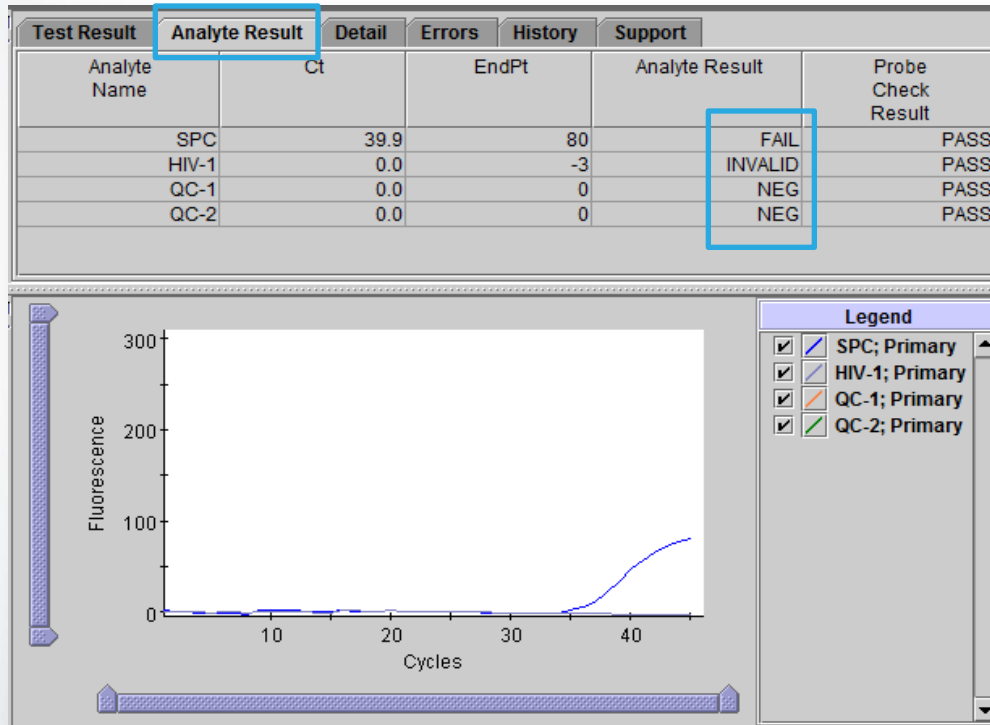


# Fatores que afetam negativamente os resultados

- Colheita incorreta da amostra
  - Não foi avaliado o desempenho com outros dispositivos de colheita e tipos de amostra
- Transporte ou conservação incorretos da amostra colhida
  - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento correto
- Procedimento de análise incorreto
  - Modificação de procedimentos de análise, erros técnicos ou troca de amostras podem afetar os resultados do teste
  - Para se evitarem resultados errôneos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções do folheto informativo
- Substância interferente
  - Podem observar-se resultados falsos negativos ou resultados inválidos na presença de substâncias interferentes

# Resultado INVÁLIDO (INVALID)

INVALID



Não é possível determinar a presença ou a ausência do alvo HIV-1

- SPC: FALHOU (FAIL)

- O valor de Ct do SPC não está dentro do intervalo válido

- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

## — Causas possíveis

- Colheita incorreta da amostra (por exemplo, utilização de um tubo com heparina)
- Preparação incorreta da amostra
- Conservação incorreta dos cartuchos
- Processamento ineficiente da amostra no cartucho
- Presença de inibidores na amostra

## — Solução

- Repetir o teste com um cartucho novo e uma amostra nova

# Interferências no ensaio

- Substâncias potencialmente interferentes
  - Foi avaliado um total de 5 substâncias endógenas
  - Demonstrou-se que níveis elevados destas substâncias endógenas **não afetaram** a especificidade do ensaio nem interferiram na detecção do HIV-1

<b>Substance</b>	<b>Tested Concentration</b>
Albumin (BSA)	90 mg/mL
Bilirubin	0.2 mg/mL
Hemoglobin	5 mg/mL
Human DNA	4 µg/mL
Triglycerides	30 mg/mL

# Resultado ERRO (ERROR) (2096/2097)



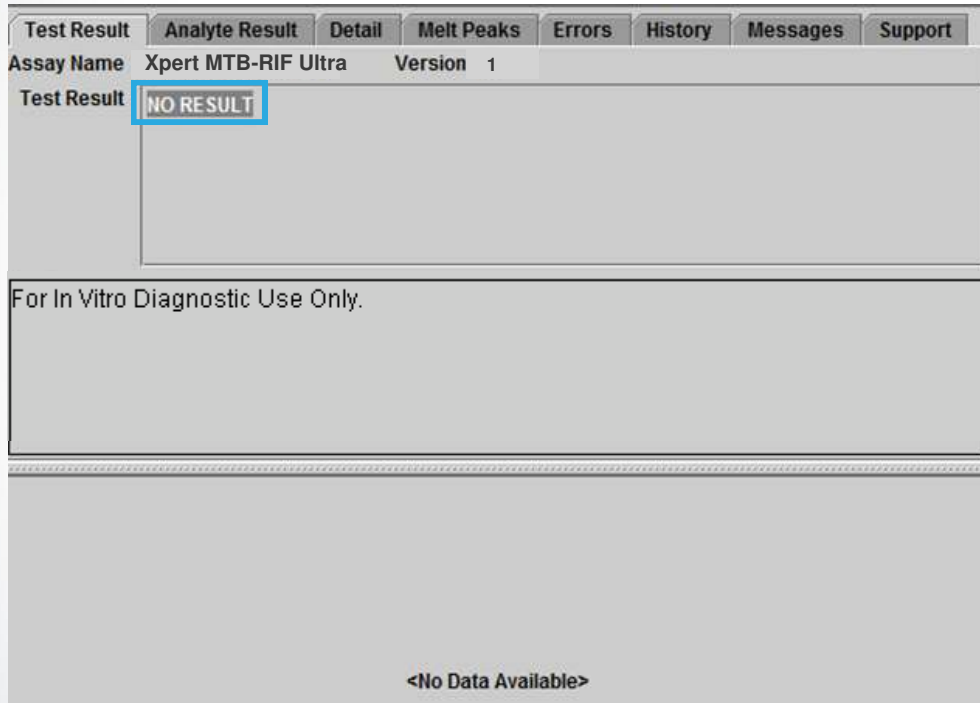
Test Result	Analyte Result	Detail	<b>Errors</b>	History	Support
Troubleshoot					
#	Description	Detail			
1	Operation terminated	Error 2097: Assay-Specific Termination Error #2: 46, 29, 1, 0			

A adequação do volume da amostra (SVA) é aprovada se cumprir os critérios de aceitação validados.

Código de erro	Causa	Solução
<b>2096</b>	Nenhuma amostra adicionada	<ul style="list-style-type: none"><li>– Certifique-se de que a amostra é adicionada ao cartucho</li><li>– Certifique-se de que o cartucho é colocado no instrumento dentro de 30 minutos após a adição da amostra</li></ul>
<b>2097</b>	Não foi adicionada amostra suficiente	<ul style="list-style-type: none"><li>– Certifique-se de que é adicionado ao cartucho um volume de amostra mínimo</li><li>– Certifique-se de que o cartucho é colocado no instrumento dentro de 30 minutos após a adição da amostra</li></ul>

# SEM RESULTADO (NO RESULT)

NO RESULT



The screenshot displays the software interface for the Xpert MTB-RIF Ultra assay. At the top, there are several tabs: 'Test Result', 'Analyte Result', 'Detail', 'Melt Peaks', 'Errors', 'History', 'Messages', and 'Support'. Below the tabs, the 'Assay Name' is 'Xpert MTB-RIF Ultra' and the 'Version' is '1'. The 'Test Result' field is highlighted with a blue box and contains the text 'NO RESULT'. Below this, there is a section for 'For In Vitro Diagnostic Use Only.' and at the bottom, the text '<No Data Available>' is displayed.

- Não foi possível determinar a presença ou ausência do **MTB**.
  - **ALVO 1: SEM RESULTADO (NO RESULT)**
  - **CONTROLO: SEM RESULTADO (NO RESULT)**
- Verificação da sonda: NA (não aplicável) (NA [not applicable])

## Causas possíveis

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

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

## Solução

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

# 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), colha uma amostra nova*

3



Obtenha um cartucho novo

Rotule apropriadamente como repetição do teste no cartucho novo

Processe a amostra de acordo com o folheto informativo

4



Execute o teste no sistema GeneXpert



# 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 de software e, caso se aplique, número de etiqueta de serviço (Service Tag) do computador
- Registre a sua reclamação através da hiperligação seguinte <http://www.cepheid.com/us/support>

Região	Telefone	E-mail para assistência técnica
EUA	+ 1 888 838 3222	<a href="mailto:techsupport@cepheid.com">techsupport@cepheid.com</a>
Austrália e Nova Zelândia	+ 1800 107 884 (AU) + 0800 001 028 (NZ)	<a href="mailto:techsupportANZ@cepheid.com">techsupportANZ@cepheid.com</a>
Brasil e América Latina	+ 55 11 3524 8373	<a href="mailto:latamsupport@cepheid.com">latamsupport@cepheid.com</a>
China	+ 86 021 5406 5387	<a href="mailto:techsupportchina@cepheid.com">techsupportchina@cepheid.com</a>
França	+ 33 563 825 319	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Alemanha	+ 49 69 710 480 480	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Índia, Bangladeche, Butão, Nepal e Sri Lanka	+ 91 11 48353010	<a href="mailto:techsupportindia@cepheid.com">techsupportindia@cepheid.com</a>
Itália	+ 39 800 902 567	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Japão	+ 0120 95 4886	<a href="mailto:support@japan.cepheid.com">support@japan.cepheid.com</a>
África do Sul	+ 27 861 22 76 35	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Reino Unido	+ 44 3303 332 533	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Bélgica e Países Baixos	+33 563 825 3319	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>
Outros países da Europa, do Médio Oriente e de África	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	<a href="mailto:support@cepheideurope.com">support@cepheideurope.com</a>





Obrigado.



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