

Formazione per l'esecuzione del saggio: Xpert[®] Norovirus

Assistenza tecnica di Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid**[®]
A better way.

Scaletta del programma di formazione

- **Formazione Xpert Norovirus**
 - Reagenti
 - Raccolta del campione
 - Conservazione e manipolazione del kit
 - Precauzioni
 - Preparazione della cartuccia
- **Controllo qualità**
- **Analisi dei risultati**
- **Discussione, domande e risposte**



Obiettivi della formazione Xpert Norovirus

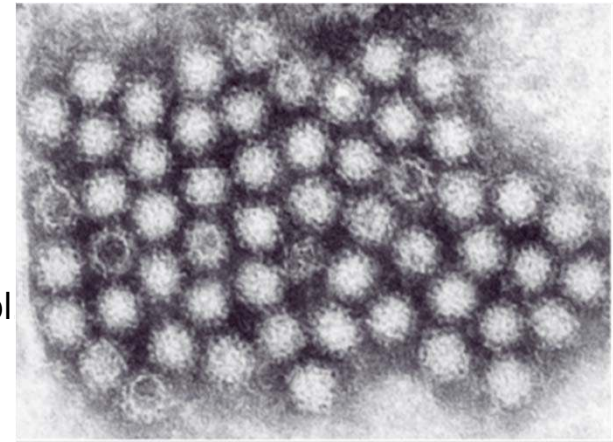
Al termine della formazione, l'operatore sarà in grado di:

- **conservare e maneggiare correttamente la cartuccia Xpert Norovirus e il kit per il saggio;**
- **seguire le corrette precauzioni di sicurezza del laboratorio;**
- **raccogliere una quantità giusta di campione di analisi e trasportarlo;**
- **predisporre la cartuccia ed eseguire il saggio;**
- **refertare i risultati generati dal software;**
- **capire la strategia di controllo del saggio.**

Panoramica sulla patologia

Cos'è il norovirus?

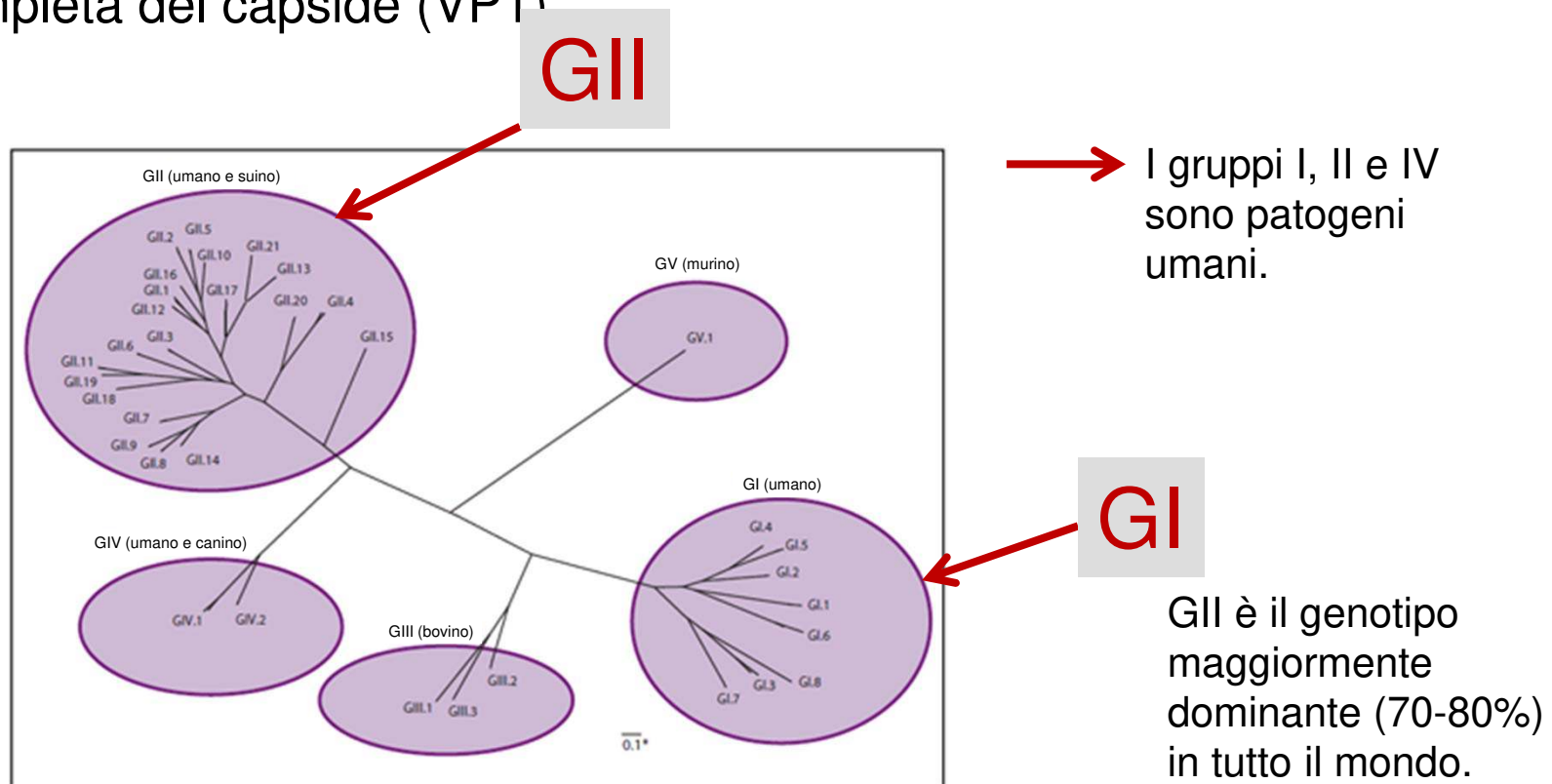
- Il norovirus è la causa più frequente di gastroenterite infettiva (diarrea e vomito) ed è responsabile del 50% delle gastroenteriti virali in tutto il mondo.¹
- È un virus a singolo filamento di RNA, altamente contagioso, la cui trasmissione avviene tramite cibi o acqua contaminati da materiale fecale, direttamente da persona a persona o via aerosol
- I soggetti a maggior rischio sono i pazienti immunocompromessi, gli anziani e i bambini.
- Le epidemie di norovirus negli istituti sanitari richiedono la messa in atto immediata di misure di controllo dell'infezione e la chiusura dei reparti.
- I pazienti sospetti di aver contratto l'infezione possono essere messi in isolamento in attesa del risultato del test.
- Il genogruppo I (GI) e il genogruppo II (GII) del norovirus causano la maggior parte delle infezioni nell'uomo.



¹ CDC MMWR 2011.60 (3)

Classificazione dei norovirus

I norovirus possono essere classificati in 5 genogruppi (I – V) e 32 genotipi, in base alla divergenza di sequenza nella proteina completa del capside (VP1)



La soluzione Cepheid



- **Rilevamento simultaneo**
 - **GI e GII**
- **Due controlli per ogni singolo campione**
 - **Controllo per il trattamento dei campioni (Sample Processing Control, SPC)**
 - **Controllo per la verifica della sonda**
- **Sensibilità e specificità elevate**
- **Semplice e facile da utilizzare**
 - **Sistema con cartuccia chiusa**
- **Risultati in circa 90 minuti**
 - **Cioè conclusione anticipata del saggio (Early Assay Termination, EAT)**
- **Risultati su richiesta 24 ore al giorno, 7 giorni su 7**
- **Accesso casuale**

Uso previsto

Il saggio Xpert Norovirus Assay, eseguito sui sistemi degli strumenti Cepheid GeneXpert[®], è un test diagnostico qualitativo *in vitro* per la rapida identificazione e differenziazione dei norovirus di genogruppo I e genogruppo II da campioni di feci liquide non trattato o senza conservante, prelevati da soggetti con sintomi di gastroenterite acuta. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa in tempo reale (rRT-PCR) automatizzata per il rilevamento dell'RNA dei norovirus. Il saggio Xpert Norovirus Assay è indicato come ausilio nella diagnosi delle infezioni da norovirus.

Requisiti dei sistemi e dei reagenti

Sistemi GeneXpert

- **Software GX DX v4.3 o superiore**

Kit di analisi (CE-IVD)

- **GXNOV-CE-10**

Ulteriori articoli necessari ma non forniti

- Tampone asciutto monouso (SDPS-120)
- Pipette di trasferimento monouso
- Miscelatore vortex

Kit per il saggio Xpert Norovirus

	Xpert Norovirus Assay
Numero di catalogo	GXNOV-CE-10
Test eseguibili con ciascun kit	10
Flaconi di reagente per il campione contenuti nel kit	10
Contenuto della cartuccia per il test	Microsfere di reagente
	Reagenti liquidi
IT Dit	File di definizione del saggio (Assay Definition File, ADF)
	Istruzioni per l'importazione del file ADF
	Foglietto illustrativo (PDF)
Conservazione	da 2 ° C a 8 ° C



Raccolta, trasporto e conservazione del campione Xpert Norovirus

- **Tipo di campione**
 - Campione di feci liquide non trattato o senza conservante in un contenitore pulito
- **Raccolta del campione**
 - Per la raccolta dei campioni per l'analisi dei norovirus, attenersi alle linee guida del proprio istituto
- **Trasporto e conservazione del campione**
 - Trasportare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C
 - Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 2 giorni dopo la data della raccolta

Buona prassi di laboratorio

Predisposizione nel laboratorio PCR

- Preparazione cartuccia/reagente → Aggiunta campione → Rilevamento

Conservazione dei campioni e dei reagenti

- Conservare i campioni separatamente dai reagenti per evitare la contaminazione dei reagenti.

Apparecchiature

- Usare puntali per pipetta con filtro, quando necessario, per le diluizioni CQ
- Per la calibrazione e la manutenzione delle apparecchiature di laboratorio, attenersi alle raccomandazioni dei relativi produttori.

Buona prassi di laboratorio, seguito

Manutenzione degli spazi di lavoro

- Pulire le superfici di lavoro con soluzione contenente candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10, seguita da etanolo al 70% o alcol isopropilico al 70%. Asciugare le superfici di lavoro con un panno.
- In caso di contaminazione, pulire a fondo l'area contaminata con soluzione contenente candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10, DNA AWAY o perossido di idrogeno al 3% (p/v) e risciacquare bene con acqua. Asciugare le superfici di lavoro con un panno.

Personale

- Indossare camici da laboratorio e guanti puliti
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro.

Area del banco da laboratorio

- Pulire regolarmente l'area del banco da laboratorio.
- Mantenere privo di polvere il retro dello strumento.

Xpert Norovirus Conservazione e manipolazione del kit



- **Conservare i kit del test a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Non utilizzare cartucce scadute.**
- **Ciascuna cartuccia monouso serve per l'esecuzione di un test. Non riutilizzare le cartucce usate.**
- **Non aprire le cartucce fino al momento di eseguire il test.**
 - **Le cartucce vanno utilizzate entro 30 minuti dall'apertura del coperchio.**
- **Evitare contaminazione crociata durante la manipolazione dei campioni.**
 - **Cambiarsi i guanti se si bagnano o vengono a contatto con campioni di analisi.**
 - **Cambiarsi i guanti prima di lasciare l'area di lavoro e quando vi si entra.**
- **Non utilizzare una cartuccia che sia stata lasciata cadere o agitata dopo avervi aggiunto il campione.**
- **Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione sia danneggiata.**

Tampone per il trattamento del campione per l'analisi dei norovirus



TACCA

Tampone monouso Cepheid, codice prodotto SDPS-120

Xpert Norovirus – Quantità giusta di campione



Campione troppo piccolo



Quantità giusta



Campione troppo grande

Protocollo di analisi per l'Xpert Norovirus Assay

Preparazione della cartuccia Xpert®

- Xpert MRSA
- Xpert MRSA/SA SSTI
- Xpert C. difficile
- Xpert SA Nasal Complete Assay
- Xpert vanA/vanB
- Xpert Norovirus

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

Per una copia della SDS, consultare il sito: www.cepheid.com oppure www.cepheidinternational.com

Assistenza Tecnica di Cepheid
Ufficio USA
+1 (888) 838-3222, opzione 2
techsupport@cepheid.com
Ufficio Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheideurope.com



- 1 Per ogni campione procurarsi una cartuccia Xpert e un fiaconcino di reagente per campioni.
- 2 Inserire il tampone nel fiaconcino del reagente per campioni.
- 3 Spezzare il tampone in corrispondenza della tacca posta accanto all'apertura del fiaconcino.
- 4 Chiudere il fiaconcino del reagente per campioni e miscelare con il vortex per 10 secondi.
- 5 Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.
- 6 Aspirare l'intero contenuto del fiaconcino di reagente per campioni con una pipetta di trasferimento monouso.
- 7 Svotare la pipetta nella camera della cartuccia.
- 8 Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.
- 9 Iniziare il test entro l'intervallo di tempo specificato nel foglietto illustrativo.



Nota - Non tenere il tampone al di sotto della tacca. Utilizzare una garza o un materiale simile per ridurre al minimo il rischio di contaminazione.

© 2014 Cepheid

301-10491, Rev. B, marzo 2014

Sintesi del protocollo Xpert Norovirus



Cioè conclusione anticipata del saggio (Early Assay Termination, EAT)

- **Che cosa significa?**
 - Monitoraggio in tempo reale del progresso della reazione
 - Conclusione della reazione quando viene oltrepassata la soglia di ciclo di una specifica reazione
- **Quali sono i vantaggi?**
 - I risultati positivi vengono refertati immediatamente
 - Nel caso di interventi in cui il tempo è un fattore cruciale, si risparmiano minuti preziosi per i pazienti che ne hanno più bisogno

Controllo qualità

Per maggiori dettagli consultare il foglietto illustrativo



 **Cepheid**[®]
A better way.

Strategia di controllo del saggio Cepheid

- **Ciascuna cartuccia Xpert è un dispositivo di test chiuso.**
 - **Cepheid ha ideato specifici metodi molecolari con controlli interni che permettono al sistema di rilevare specifiche modalità di errore in ciascuna cartuccia.**
 - **Controllo del sistema dello strumento: Verifica stato**
 - **Controllo del reagente: Verifica della sonda**
 - **Controllo per il trattamento dei campioni: SPC e/o SAC**
 - **Controllo dell'amplificazione: SPC e/o SAC e/o IC**

Controllo del sistema dello strumento – 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 non funzionano come previsto, il sistema segnalerà un ERRORE nel risultato.**

Controllo del reagente – PCC

- Dopo la preparazione del campione, la ricostituzione della microsfera e il riempimento della provetta (prima dell'esecuzione dei cicli termici), vengono misurati svariati valori di fluorescenza a temperature differenti.
- I valori rilevati vengono confrontati con le impostazioni predefinite stabilite da Cepheid.
- La verifica della sonda serve a individuare:
 - microsfere mancanti 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 del reagente
 - riempimento incompleto della provetta di reazione
 - degrado della sonda
- Se la verifica della sonda non riesce, il sistema segnalerà un **ERRORE** nel risultato.

Controllo per il trattamento dei campioni – SPC

- Il controllo per il trattamento dei campioni (Sample Processing Control, SPC) valuta l'efficacia delle fasi di preparazione del campione, incluso il riempimento della provetta di reazione.
- L'SPC è Armored RNA.
- L'SPC serve a individuare:
 - primer/sonda o microsfere enzimatiche mancanti
 - ricostituzione incompleta del reagente
 - riempimento incompleto della provetta di reazione
 - degrado dell'enzima
 - lisi del campione, estrazione dell'acido nucleico e integrità dell'acido nucleico
 - inibizione del campione
- L'SPC può essere negativo o positivo in un campione analita-positivo.
- Se l'SPC non dà i risultati previsti in un campione analita-negativo, il sistema segnalerà un risultato NON VALIDO.

Controlli esterni disponibili in commercio

Codice prodotto ZeptoMetrix	Descrizione	Configurazione
NATNOVI-ST	• Norovirus GI (positivo)	1 mL
NATNOVII-ST	• Norovirus GII (positivo)	1 mL
NATROTA-ST	• Rotavirus Wa (negativo)	1 mL

<http://www.zeptoMetrix.com>

•Altre opzioni

- **Campioni di pazienti noti come positivi e negativi**

• **I controlli esterni devono essere usati in conformità con i requisiti degli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti.**

Analisi dei risultati

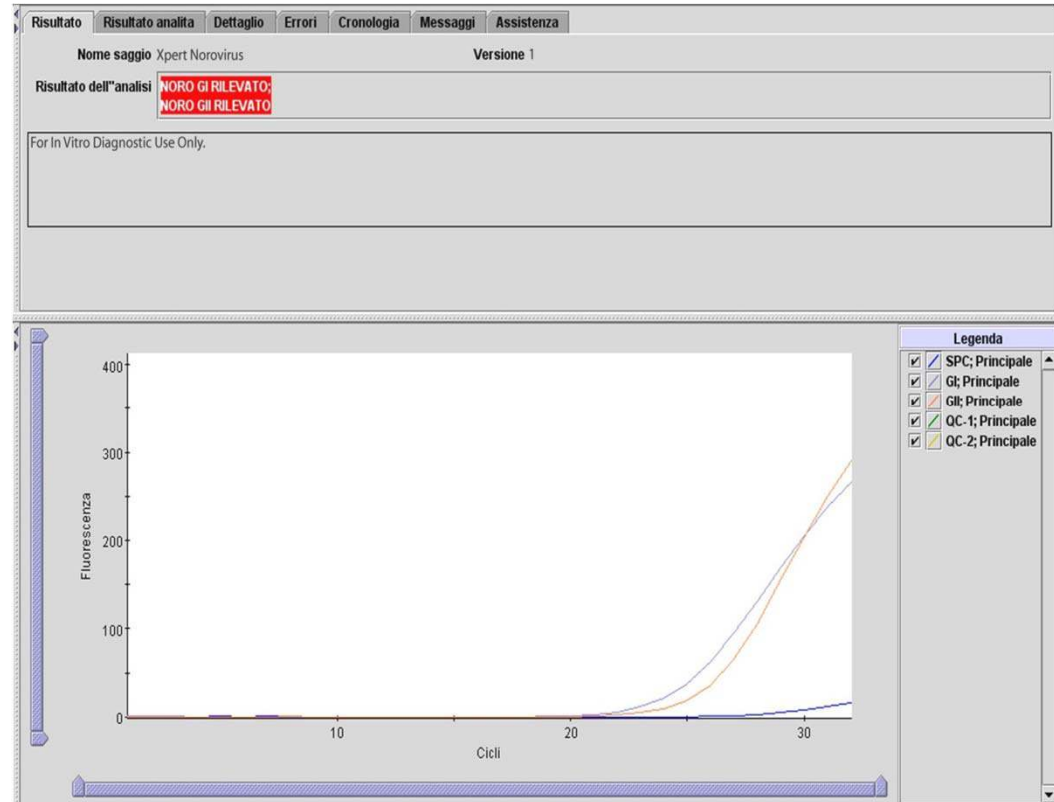
Per maggiori dettagli consultare il foglietto illustrativo



 **Cepheid**[®]
A better way.

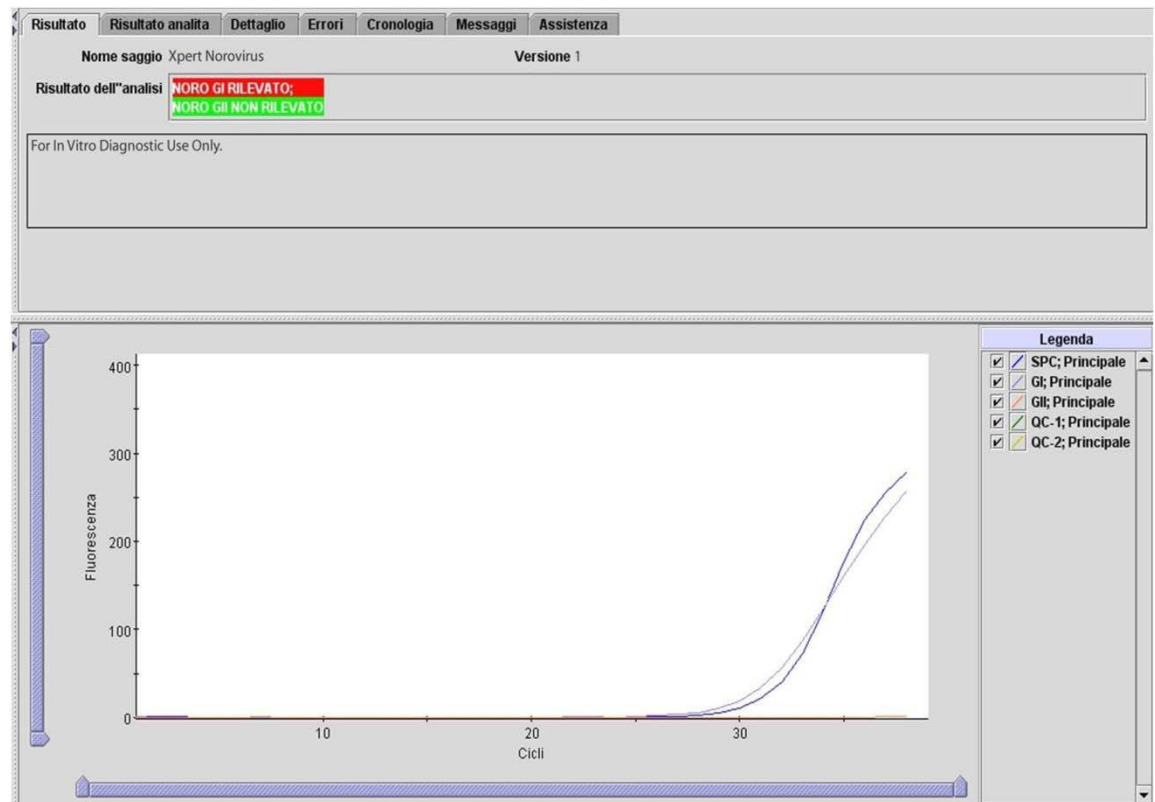
Risultati Xpert Norovirus: Noro GI Rilevato, Noro GII Rilevato

- Le sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus di genogruppo I (GI) e di genogruppo II (GII) sono state rilevate.
- SPC: non applicabile (NA). L'SPC viene ignorato, dato che l'amplificazione della sequenza bersaglio dei norovirus può competere con questo controllo.
- PCC: AMMESSO; tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.



Risultati Xpert Norovirus: Noro GI Rilevato, Noro GII Non Rilevato

- Le sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus di genogruppo I (GI) sono state rilevate.
- Le sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus di genogruppo II (GII) non sono state rilevate.
- SPC: ammesso; l'SPC presenta un Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra della relativa soglia impostata.
- PCC: AMMESSO; tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

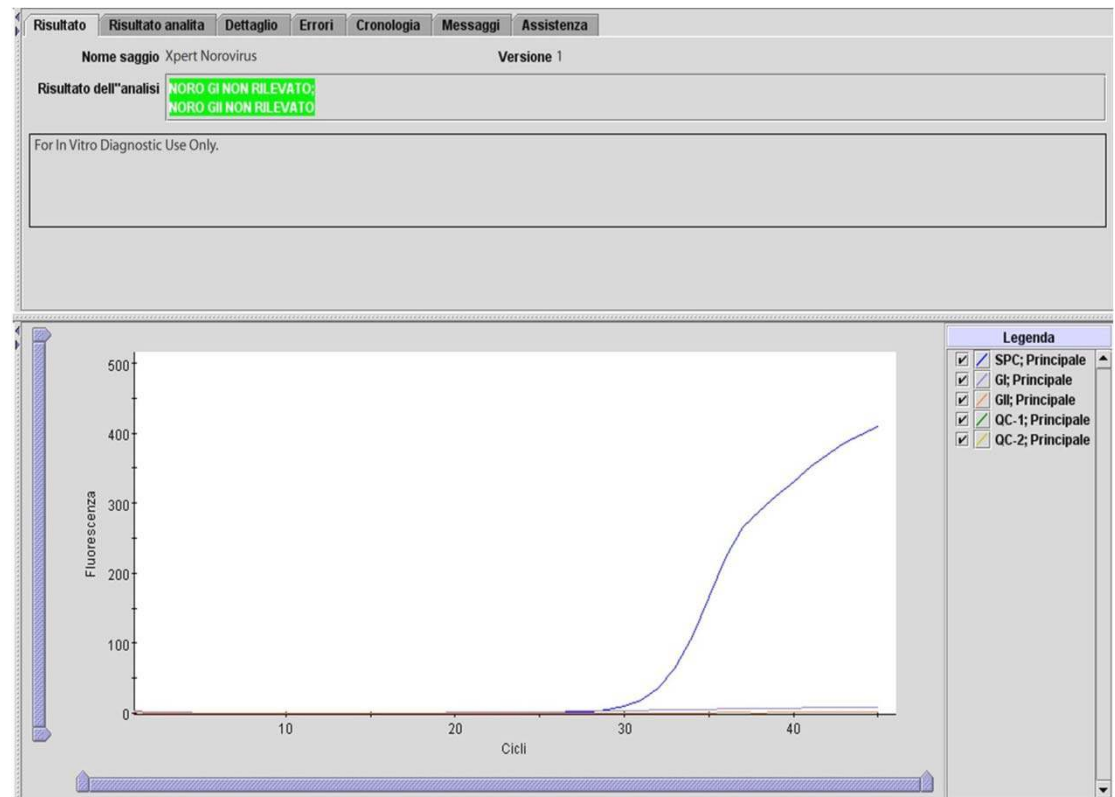


Risultati Xpert Norovirus: Noro GI Non Rilevato, Noro GII Non Rilevato

•Le sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus di genogruppo I (GI) e di genogruppo II (GII) non sono state rilevate.

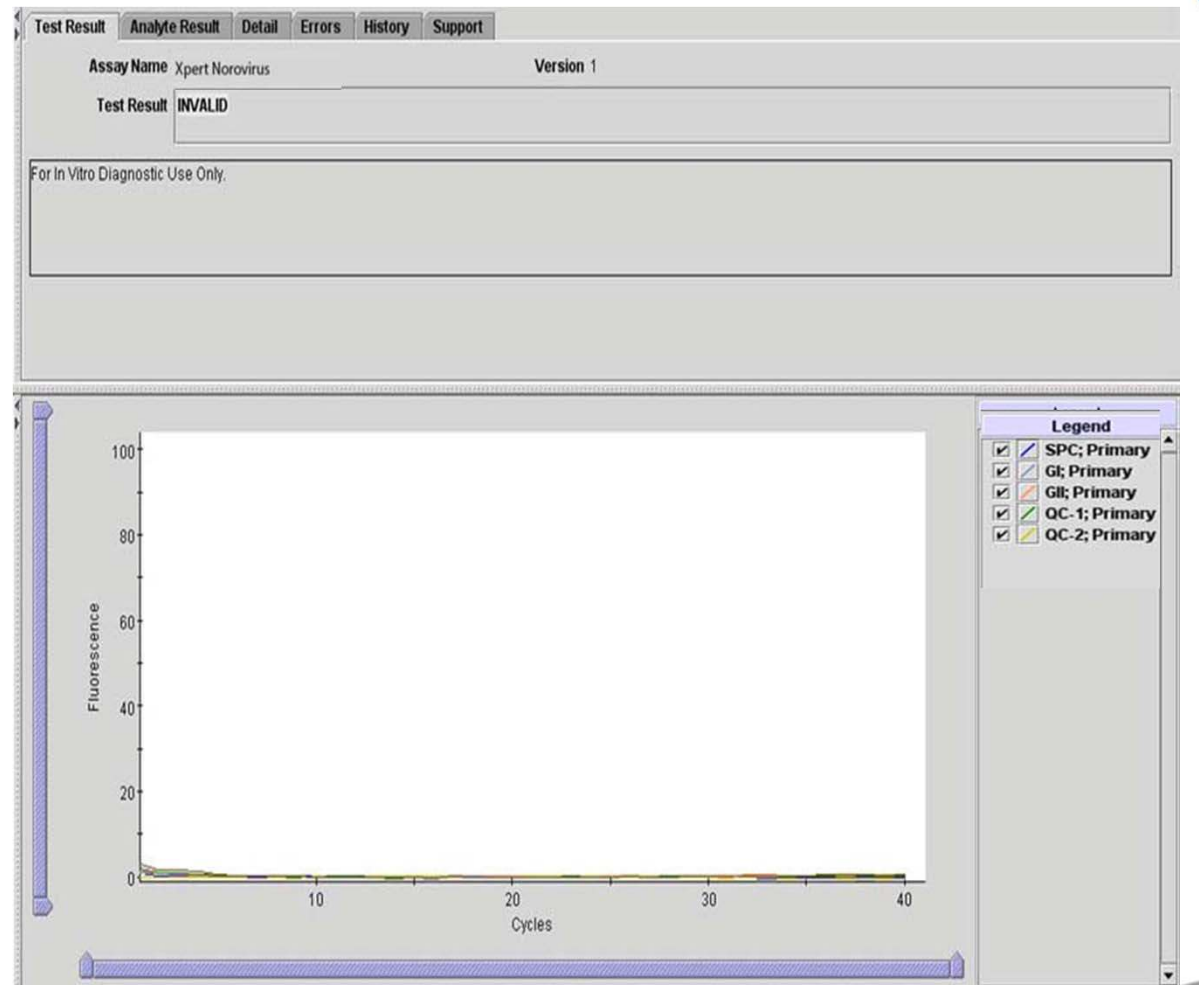
•SPC: ammesso; l'SPC presenta un Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra della relativa soglia impostata.

•PCC: AMMESSO; tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.



Risultati Xpert Norovirus: NON VALIDO

- Impossibile determinare la presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus. Ripetere il test secondo le istruzioni riportate nella Sezione 14 del foglietto illustrativo, Procedura di ripetizione del test.
- Il risultato della sequenza bersaglio dell'SPC è negativo. Il Ct dell'SPC non rientra nel range di validità e l'endpoint di fluorescenza è al di sotto del valore minimo.
- PCC: AMMESSO; tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.



Risultato Xpert Norovirus: ERRORE

- Impossibile determinare la presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio dell'RNA dei norovirus. Ripetere il test secondo le istruzioni riportate nella Sezione 14 del foglietto illustrativo, Procedura di ripetizione del test.
 - SPC: NESSUN RISULTATO
 - PCC: RESPINTO*; uno o più risultati della verifica della sonda non sono validi. Il PCC probabilmente non è riuscito perché la provetta di reazione è stata riempita in modo non appropriato o è stato rilevato un problema di integrità della sonda.
- * Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.

The screenshot displays the Xpert Norovirus test result interface. At the top, there are tabs for Test Result, Analyte Result, Detail, Errors, History, Messages, and Support. The Assay Name is Xpert Norovirus, and the Version is 1. The Test Result is displayed as ERROR in a yellow box. Below this, there is a section for 'For In Vitro Diagnostic Use Only.' The bottom part of the screenshot shows a Troubleshoot section with a table of error details.

#	Description	Detail	Time
1	Post-run analysis error	Error 5006: [GII] probe check failed. Probe check value of 55.4 for reading number 1 was above the maximum of 54.0	03/18/14 09:50:56
2	Post-run analysis error	Error 5006: [GII] probe check failed. Probe check value of 55.0 for reading number 3 was above the maximum of 54.0	03/18/14 09:50:56




Nessun risultato

La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test (ad esempio, l'operatore ha arrestato un test in corso).

Motivi per ripetere il saggio

- Un risultato **NON VALIDO** indica che il campione non è stato trattato in modo appropriato, la PCR è stata inibita o il campione è risultato inadeguato.
- **ERRORE** indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo o che è stato superato i limiti massimi della pressione.
- **NESSUN RISULTATO** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha arrestato un test in corso, si è verificato un errore durante il caricamento o il software è stato chiuso prematuramente.

Procedura di ripetizione del test

1	Gettare la cartuccia usata.	
2	Ottenere il campione residuo. Se il volume del campione residuo è insufficiente, o se la procedura di ripetizione del test continua a dare NON VALIDO, ERRORE o NESSUN RISULTATO , raccogliere un nuovo campione.	
3	Ripetere il test con una nuova cartuccia e un nuovo reagente per il campione.	
4	Seguire le istruzioni su come eseguire un test riportate nel foglietto illustrativo.	

Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- **Raccolta non corretta del campione di analisi**
 - Non sono state valutate le prestazioni con altri dispositivi di raccolta e altri tipi di campioni di analisi.
 - Per i saggi contenenti il controllo SAC, un campione di analisi che non contiene cellule umane darà un risultato non valido.
- **Trasporto o conservazione non corretti del campione di analisi raccolto**
 - Le condizioni di conservazione e trasporto sono specifiche per i campioni di analisi.
 - 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.
 - Un errore tecnico o lo scambio dei campioni può influire sui risultati.
 - La stretta osservanza delle istruzioni del foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erranei.
- **Sostanza interferente**
 - In presenza di una sostanza interferente si possono ottenere risultati falsi negativi o risultati non validi.
- **Il numero di organismi contenuti nel campione di analisi è inferiore al limite di rilevamento del test.**
- **Per informazioni sul tasso di indeterminati, consultare il foglietto illustrativo.**

Sostanze interferenti

- **Si può osservare interferenza con il saggio in presenza di:**
 - **benzalconio** (salviettine antisettiche) **superiore o uguale allo 0,2% p/v**
 - **bismuto a una concentrazione superiore al 5% p/v**
- **Per i dati sulle sostanze interferenti, fare riferimento al foglietto illustrativo di Xpert Norovirus.**

Discussione, domande e risposte



 **Cepheid**[®]
A better way.

Assistenza tecnica

- **Cepheid fornisce assistenza tecnica sul campo, telefonicamente, via fax e per e-mail.**
- **Nord America:**
 - **Telefono: +1 (888) 838-3222**
 - **Fax: +1 (408) 716-2550**
 - **E-mail: techsupport@cepheid.com**
- **Europa, Africa, Medio Oriente, Penisola Indiana:**
 - **Telefono:**
 - Francia: + 33 5 63 82 53 19**
 - Germania: + 49 69 710 480 480**
 - Regno Unito: + 44 3303 332533**
 - Sud Africa: +27 11 234 9636**
 - Australia, Nuova Zelanda: +61 1800 107 884**
 - **Fax: +33 563 82 53 01**
 - **E-mail: support@cepheideurope.com**

Discussione, domande e risposte

