

Formación técnica en el ensayo Xpert[®] HCV Viral Load

Para uso CE-IVD exclusivamente

Centro de formación de Cepheid



Programa de formación

- **Xpert® HCV Viral Load**
 - Utilidad clínica
 - Reactivos
 - Recogida de muestras
 - Conservación y manipulación del kit
 - Preparación del cartucho
 - Controles de calidad
 - Análisis de resultados
- **Discusión**



Objetivos del curso

- **Al final del curso de formación, el usuario será capaz de:**
 - Conservar y manipular debidamente el kit del cartucho Xpert[®] HCV Viral Load y los kits de recogida de muestras.
 - Tomar las precauciones de seguridad de laboratorio adecuadas.
 - Recoger y transportar las muestras apropiadas.
 - Preparar un cartucho y llevar a cabo el ensayo.
 - Notificar los diversos resultados generados por el software.
 - Comprender la estrategia de control del ensayo.

La solución Cepheid



- Detecta y cuantifica la diana
 - ARN del HCV
 - Resultados dentro del intervalo lineal de 10 a 100 000 000 UI/ml
- Controles internos incorporados para cada muestra
 - Adecuación del volumen de la muestra (SVA)
 - Control de comprobación de la sonda (PCC)
 - Patrones cuantitativos internos alto (IQS-H) y bajo (IQS-L)
- Resultados en aproximadamente
 - 105 minutos
- Sistema de cartucho cerrado que minimiza el riesgo de contaminación
- Resultados a petición, 24 horas al día y 7 días a la semana
- Acceso aleatorio

Indicaciones

- El ensayo **Xpert® HCV VL** realizado en los sistemas del instrumento **GeneXpert®**, está diseñado para la **cuantificación rápida del ARN del virus de la hepatitis C (HCV) en suero o plasma humanos (con EDTA) procedentes de personas infectadas con el HCV**. La prueba utiliza la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y un agente fluorescente para detectar el ARN de interés para la cuantificación del HCV.
- El ensayo **Xpert HCV VL** cuantifica los genotipos 1 a 6 del HCV en un intervalo de **10 a 100 000 000 UI/ml**.
- El ensayo **Xpert HCV VL** está indicado para utilizarse como una ayuda en el **control de pacientes infectados con el HCV y tratados con antivirales**.
- La prueba mide las concentraciones de ARN del HCV al inicio del tratamiento y durante este, y puede utilizarse para **predecir la respuesta virológica sostenida y no sostenida al tratamiento para el HCV**.

Indicaciones - Avisos

- Los resultados del ensayo Xpert HCV VL también pueden utilizarse para **confirmar la infección por HCV en personas anti-HCV positivas**. En personas anti-HCV positivas que dan negativo para el ARN del HCV, puede plantearse la realización de otro ensayo de anticuerpos anti-HCV para distinguir entre verdadera exposición al HCV y falsos positivos biológicos.
- La **repetición de la prueba de ARN del HCV** podría estar indicada en los casos que hayan tenido exposición al HCV en los últimos 6 meses o que tengan indicios clínicos de enfermedad por el HCV.
- El ensayo **no** está concebido para utilizarse como prueba de HCV para el cribado de donantes de sangre.

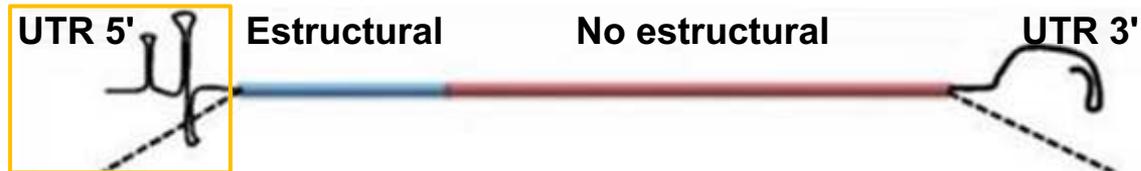
Dianas y sondas

Dianas

- Patrones cuantitativos internos alto (IQS-H) y bajo (IQS-L)
- La región más conservada del genoma del ARN del HCV

Sondas

- 3 sondas (HCV, IQS-H e IQS-L)



Requisitos de Xpert® HCV Viral Load

Sistemas GeneXpert

- Software GeneXpert DX v **4.7b** o posterior
- Software Xpertise v **6.4b** o posterior

Kits de la prueba (CE-IVD)

- GXHCV-VL-CE-10

Recogida de muestras

- Sangre completa en tubos de recogida de suero o K2-EDTA, EDTA-PPT

Otros materiales

- Equipo de protección individual (EPI)
- Lejía a 1:10
- Etanol desnaturalizado o etanol al 70 %
- Mezclador vórtex
- Centrifugadora para la preparación de plasma

Opcional

- Sistema de alimentación ininterrumpida/Protector de sobretensiones
- Impresora

Buenas prácticas de laboratorio

Equipo de protección individual (EPI)

- Use guantes y bata de laboratorio limpios
- Cámbiese los guantes cada vez que procese muestras

Área de la mesa del laboratorio

- Limpie las superficies de trabajo de forma habitual con:
 - ✓ Dilución 1:10 de lejía de uso doméstico
 - ✓ Solución de etanol al 70 %
- Después de la limpieza, asegúrese de que las superficies de trabajo estén secas

Conservación de muestras y kits

- Conserve las muestras separadas del kit para prevenir la contaminación

Equipo

- Utilice puntas con filtro cuando se recomiende
- Siga los requisitos del fabricante para la calibración y el mantenimiento del equipo

Manipulación del kit



Contenido del kit Xpert® HCV Viral Load

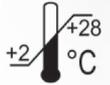
Número de catálogo	GXHCV-VL-CE-10
Cartuchos por kit	10
CD del kit	Archivo de definición del ensayo (Assay Definition File, ADF)
	Instrucciones para la importación de ensayos
	Prospecto (PDF)
Pipetas de transferencia	10 (1 ml)
Conservación	2-28 °C



Los cartuchos contienen sustancias químicamente peligrosas; consulte el prospecto y la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada.

Conservación y manipulación del kit Xpert® HCV Viral Load

- Conserve los cartuchos y los reactivos del ensayo HCV VL a una temperatura de 2–28 °C.
- Siga los procedimientos de seguridad del centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- No utilice tubos de reactivos de recogida que no haya validado Cepheid.
- Abra la tapa del cartucho del ensayo solo cuando añada la muestra, cierre la tapa y proceda con el procesamiento.



Advertencias y precauciones

- No agite el cartucho.
- No utilice un cartucho que...:
 - parezca mojado, tenga alguna fuga o en el que el precinto de la tapa parezca haberse roto.
 - parezca dañado.
 - se haya caído después de extraerlo del envase.
 - se haya caído o agitado después de habersele añadido la muestra.
 - tenga un tubo de reacción dañado.
 - se haya utilizado: cada cartucho de un solo uso se utiliza para procesar una sola prueba.
 - haya caducado.
- No vuelva a utilizar pipetas desechables usadas.



Advertencias y precauciones

- Las muestras biológicas, los dispositivos de transferencia y los cartuchos usados deben ser considerados capaces de transmitir agentes infecciosos, y requieren las precauciones habituales.
- Siga los procedimientos de eliminación de desechos de su centro para la eliminación adecuada de los cartuchos usados y los reactivos no utilizados. Estos materiales pueden presentar características propias de los residuos químicos peligrosos, que requieren procedimientos específicos de eliminación de carácter nacional o regional.
- Si las normativas nacionales o regionales no proporcionan instrucciones claras en cuanto a los procedimientos de eliminación adecuados, las muestras biológicas y los cartuchos usados deben desecharse de conformidad con las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) relativas a la manipulación y eliminación de desechos médicos.

Limitaciones del ensayo Xpert® HCV Viral Load

- Este ensayo no está concebido para utilizarse como **prueba de cribado de donantes**.
- No se ha demostrado la eficacia diagnóstica del Xpert HCV VL con otras muestras aparte de las validadas (**muestras de plasma o suero**).
- No se ha evaluado la eficacia diagnóstica de la prueba Xpert HCV VL con muestras procesadas por métodos diferentes a los descritos en el prospecto.
- Si no se siguen los procedimientos del ensayo pueden obtenerse resultados falsos.
- Los inhibidores presentes en las muestras pueden hacer que se obtengan resultados no válidos.

Recogida, conservación y transporte de muestras



Recogida de muestras para el Xpert® HCV Viral Load

- **Sangre completa**

- Recoja muestras de sangre completa en tubos con EDTA, EDTA-PPT o de suero, siguiendo las instrucciones del fabricante

Tubo con EDTA



Tubo de suero

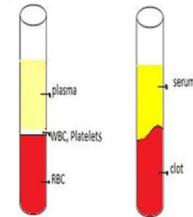


Tubo con heparina



- **Plasma/suero**

- Centrifugue para separar el plasma/suero y los hematíes según las instrucciones del fabricante
- Prepare un mínimo de 1,2 ml de plasma/suero



Recogida, transporte y conservación de muestras

	Antes de realizar pruebas	Temperatura (°C)	Tiempo de conservación
	Sangre completa anticoagulada con EDTA	+15 / +35 °C	24 horas
		+2 / +8 °C	72 horas

Las muestras de plasma son estables durante tres ciclos de congelación y descongelación como máximo.

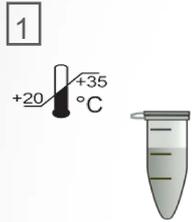
	Antes de realizar pruebas	Temperatura (°C)	Tiempo de conservación
	Plasma y suero	+15 / +35 °C	24 horas
		+2 / +8 °C	3 días
		-70 / -18 °C	6 semanas

Preparación del cartucho

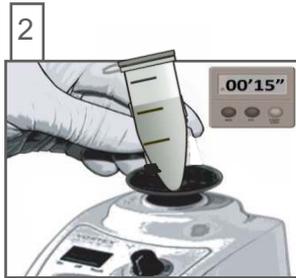


Preparación del cartucho Xpert® HCV VL

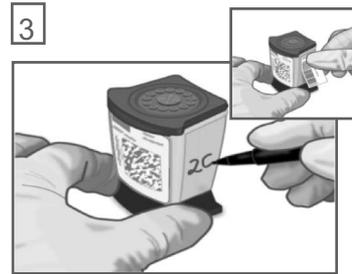
Muestra: plasma/suero



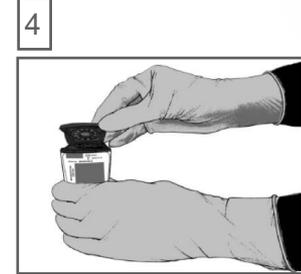
Si utiliza muestras congeladas o refrigeradas, déjelas a temperatura ambiente hasta que se descongelen completamente y se equilibren con la temperatura ambiente.



Agite la muestra equilibrada con un mezclador vórtex durante 15 segundos. Si la muestra está turbia, centrifúguela durante unos segundos.



Etiquete el lado del cartucho con el ID de la muestra.



Abra la tapa del cartucho.



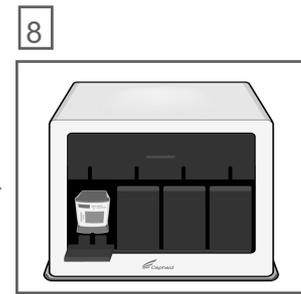
Pipeteo al menos 1 ml de la muestra utilizando la pipeta suministrada.*



Vacíe lentamente la pipeta en la cámara de muestras del cartucho.



Cierre firmemente la tapa. Inicie la prueba dentro del período especificado en el prospecto.



Inicie la prueba en el instrumento GeneXpert.



*Pipeta de transferencia del ensayo HCV VL

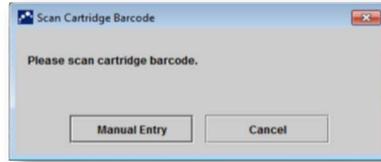
Realice una prueba

1 Cree una prueba

GeneXpert



2 Escanee los mensajes del código de barras:
ID del cartucho/paciente y/o muestra

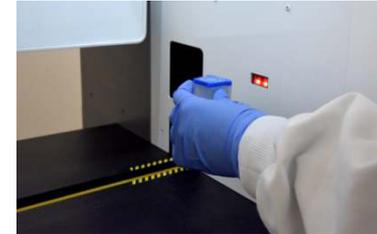
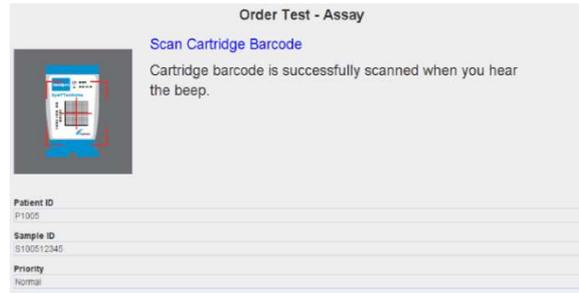


De forma predeterminada, no haga clic en **Entrada manual (Manual Entry)** ni en **Cancelar (Cancel)**

3 Escanee el cartucho



GeneXpert
Infinity



Para obtener información completa y detallada para realizar una prueba, consulte el prospecto y los manuales del operador del GeneXpert Dx o el Xpertise Dx.

Cree una prueba en el software GeneXpert Dx

- 4 Complete los campos según sea necesario
- 5 El protocolo del ensayo se selecciona automáticamente
- 6 El módulo se selecciona automáticamente
¡NO LO CAMBIE!

7 Haga clic en Iniciar prueba (Start Test)

8 Parpadeará una luz verde en el módulo
Cargue el cartucho en el módulo y cierre la puerta

Create Test

Patient ID
Sample ID
Patient ID 2
Last Name

Name
Select Assay: Xpert HCV Viral Load

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

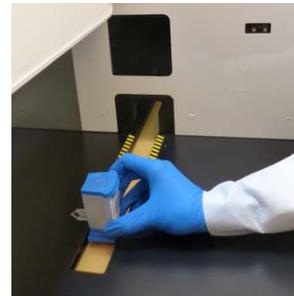


Cree una prueba en el software Xpertise Dx

- 4 Complete los campos según sea necesario
- 5 El protocolo del nombre de ensayo se selecciona automáticamente
- 6 Haga clic en ENVIAR (SUBMIT)
- 7 Coloque el cartucho en la cinta transportadora

Order Test - Test Information

Patient ID patientid	
Sample ID sampleid	
Last Name patient	First Name id
Assay* Xpert HCV Viral Load	
Reagent Lot ID* 12102	Cartridge S/N* 282769448
Expiration Date* 2018/11/04	Priority Normal
Test Type Specimen	
Sample Type Other	Other Sample Type
Notes	



Protocolo automatizado del Xpert



Controles de calidad



- **Controles de calidad del Xpert HCV VL**
 - Cada cartucho Xpert es un dispositivo analítico autónomo
 - Cepheid ha diseñado métodos moleculares específicos para incluir controles internos que permiten al sistema detectar fallos específicos dentro de cada cartucho
 - Adecuación del volumen de la muestra (SVA)
 - Controles de comprobación de la sonda (PCC)
 - Patrones cuantitativos internos IQS-L e IQS-H para cuantificar el virus del ARN del HCV

Controles de calidad internos

- **Adecuación del volumen de la muestra (SVA)**
 - Asegura que se haya añadido el volumen de muestra correcto al cartucho
- **Controles de comprobación de la sonda (PCC)**
 - Antes del paso de la PCR, se mide la señal fluorescente en todas las sondas y se compara con los ajustes preestablecidos de fábrica para monitorizar:
 - rehidratación de las microesferas
 - integridad de las sondas
 - llenado del tubo de reacción
 - estabilidad del colorante
- **Patrón cuantitativo interno alto y bajo (IQS-H y IQS-L)**
 - Denominados IQS Low (bajo) (10^3 copias/ml) e IQS High (alto) (10^6 copias/ml)
 - 2 constructos de armored RNA® no infeccioso
 - Confirman que la muestra se haya procesado correctamente
 - Detectan la inhibición asociada a la muestra de la reacción RT-PCR y la presencia del microorganismo
 - Los valores de Ct y de fluorescencia deben estar siempre dentro del intervalo válido

Controles externos comerciales disponibles

Thermofisher - <https://www.lifetechnologies.com>

Número de referencia	Descripción	Configuración	Conservación
963003	HCV Positivo Control alto	1,2 ml	- 70 °C
963002	HCV Positivo Control intermedio	1,2 ml	- 70 °C

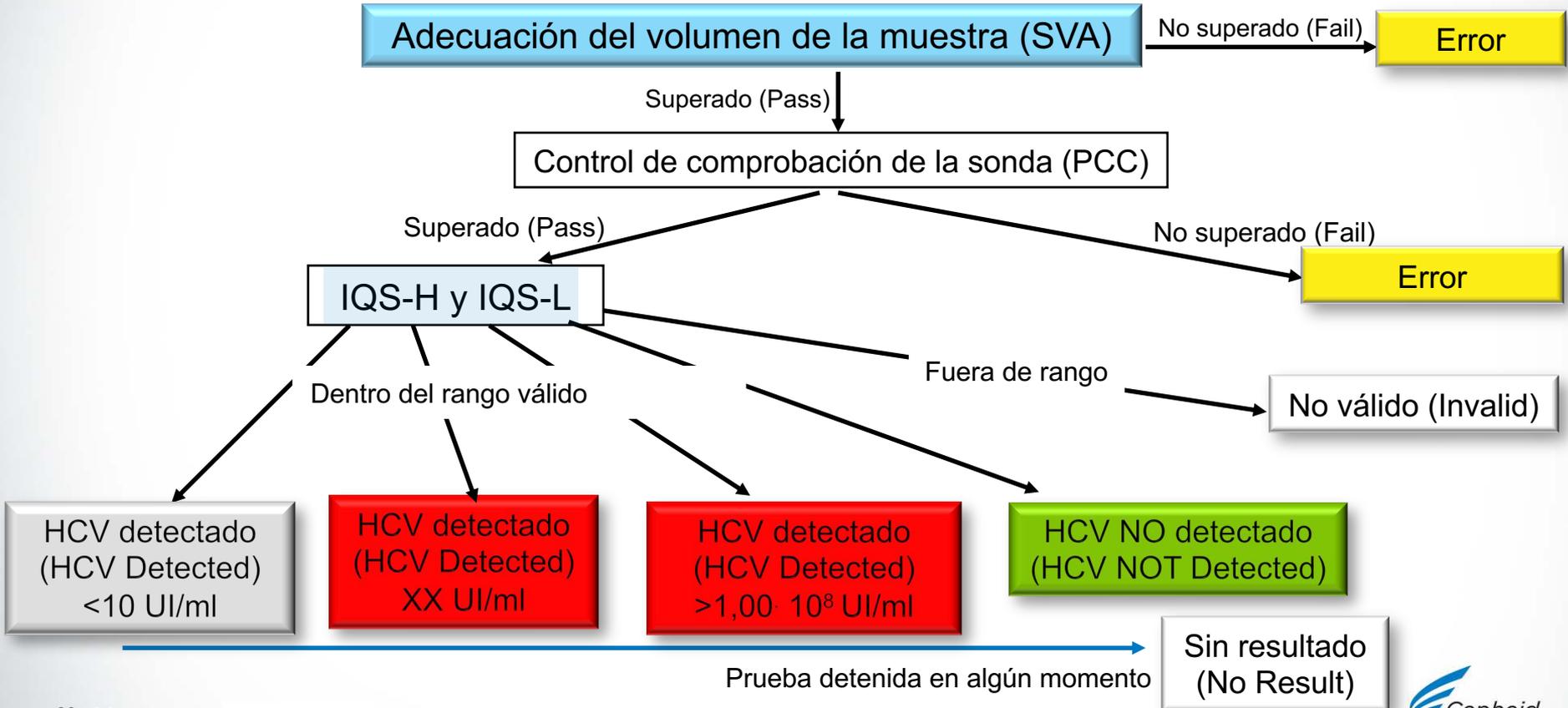
- Muchos otros proveedores de material de control de calidad también están disponibles además del descrito anteriormente.

- Los controles externos deben utilizarse de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales y estatales, según corresponda.

Interpretación de los resultados



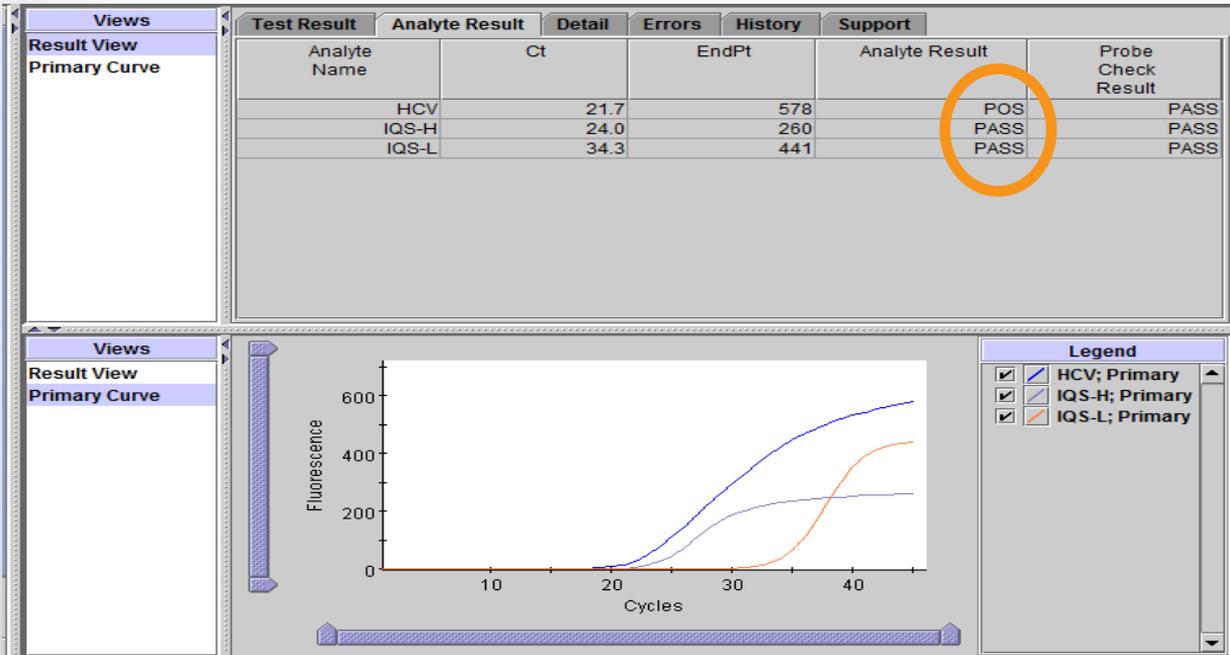
Algoritmo de interpretación de los resultados



HCV DETECTADO (HCV DETECTED) XX UI/ml

Test Result **HCV DETECTED**

Test Result **HCV DETECTED 3.02E05 IU/mL (log 5.48)**



- Se ha detectado el HCV diana en un valor cuantitativo
 - El título de ARN del HCV está dentro del intervalo lineal configurado del ensayo y el punto extremo está por encima del mínimo.
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

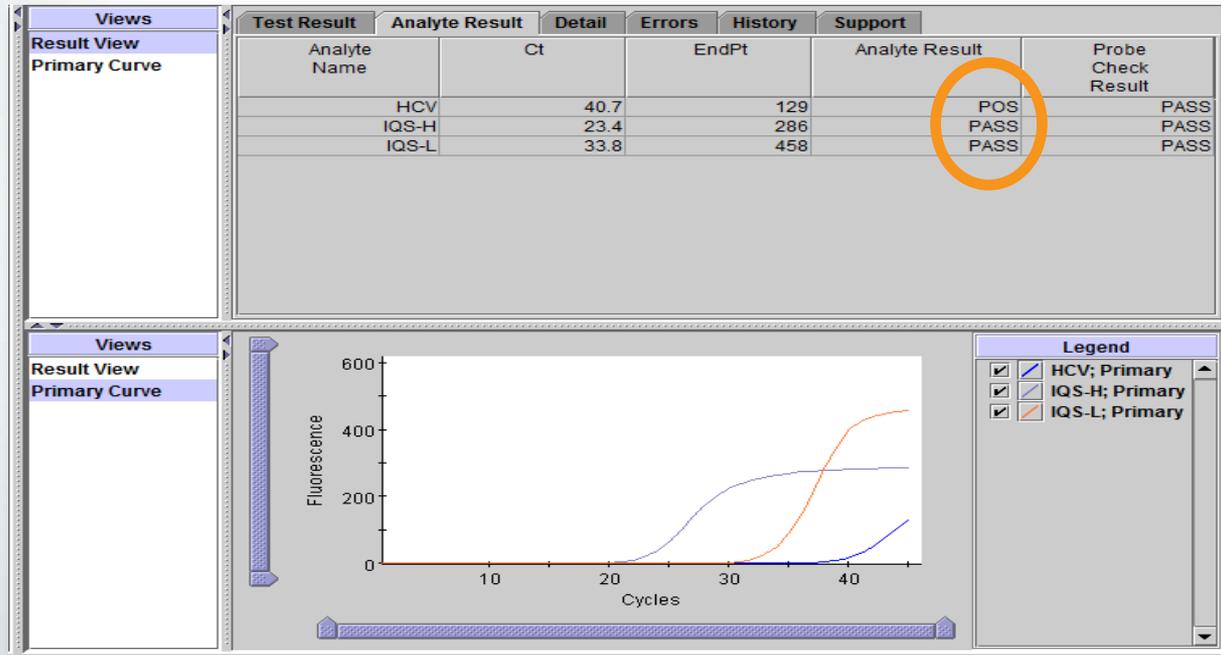
Cálculo de ejemplo:

$$3,02E05 = 3,02 \times 10^5 = 302\,000 \text{ UI/ml}$$

HCV DETECTADO (HCV DETECTED) < 10 UI/ml

Test Result HCV DETECTED

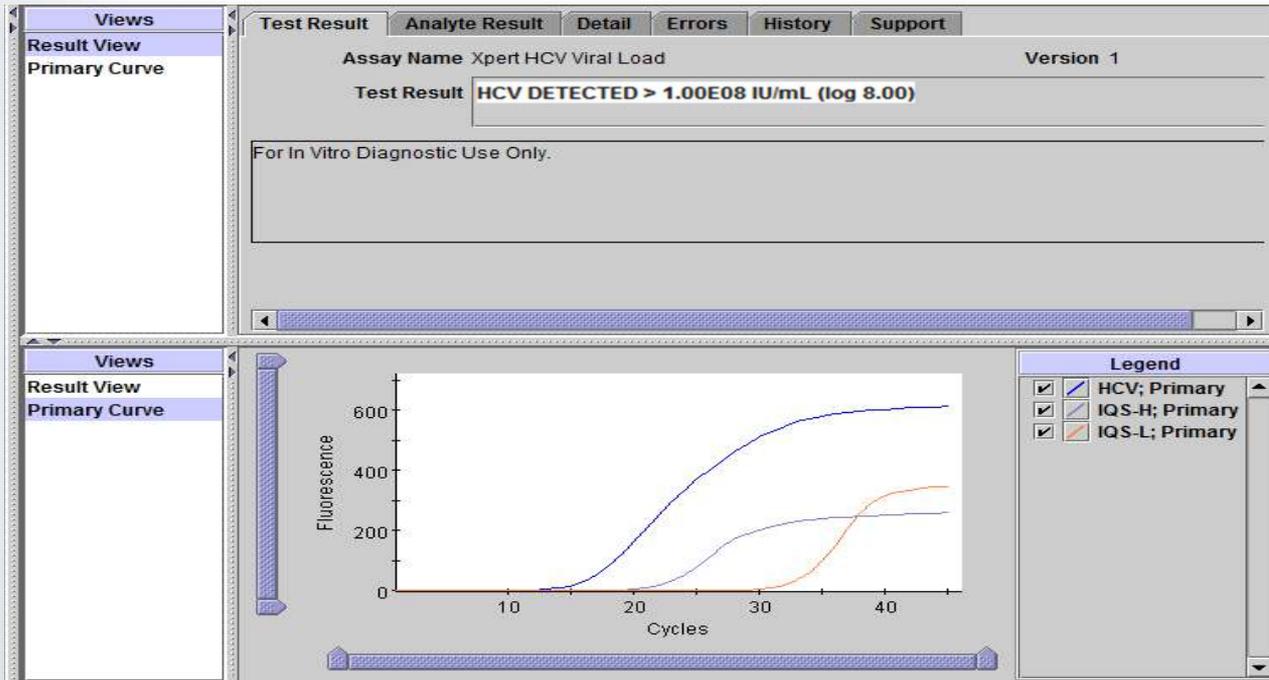
Test Result HCV DETECTED < 10 IU/mL (log 1.00)



- Se ha detectado el HCV diana por debajo del intervalo cuantitativo del ensayo
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

HCV DETECTADO (HCV DETECTED) > 1 × 10⁸ UI/ml

Test Result **HCV DETECTED**



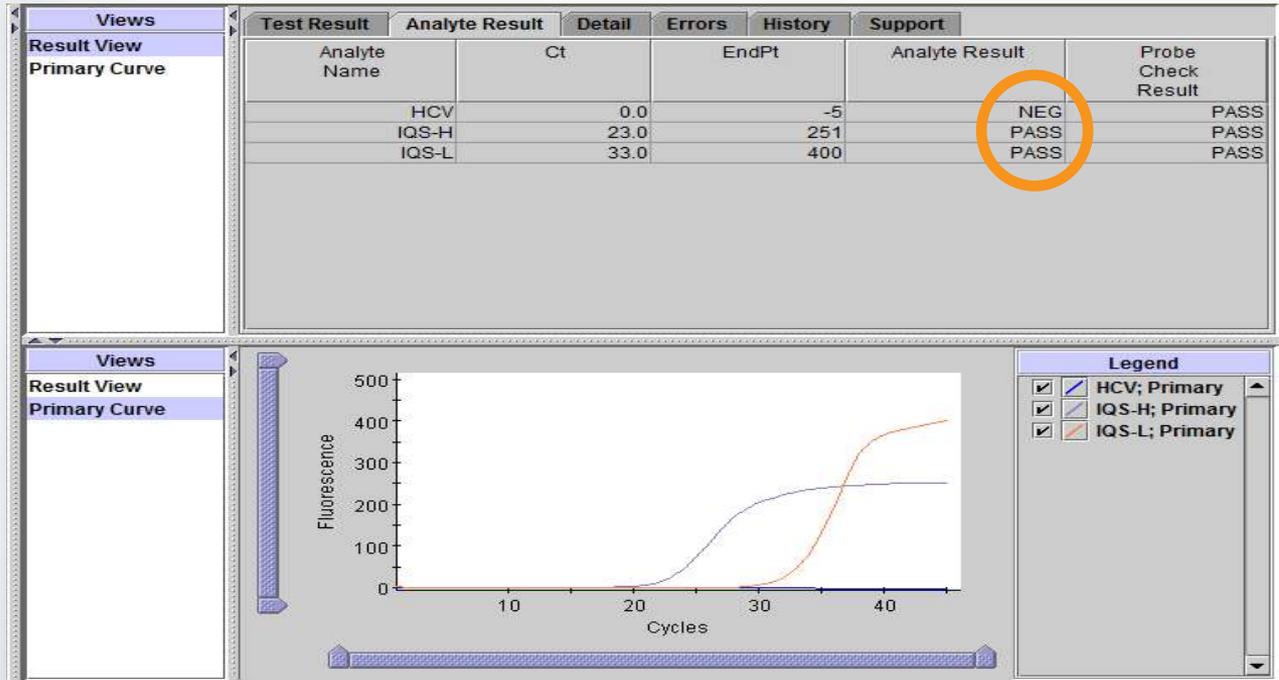
- Se ha detectado el HCV diana por encima del intervalo cuantitativo del ensayo
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

Cálculo de ejemplo:

$$1 \times 10^8 = 100\,000\,000 \text{ UI/ml}$$

HCV NO DETECTADO (HCV NOT DETECTED)

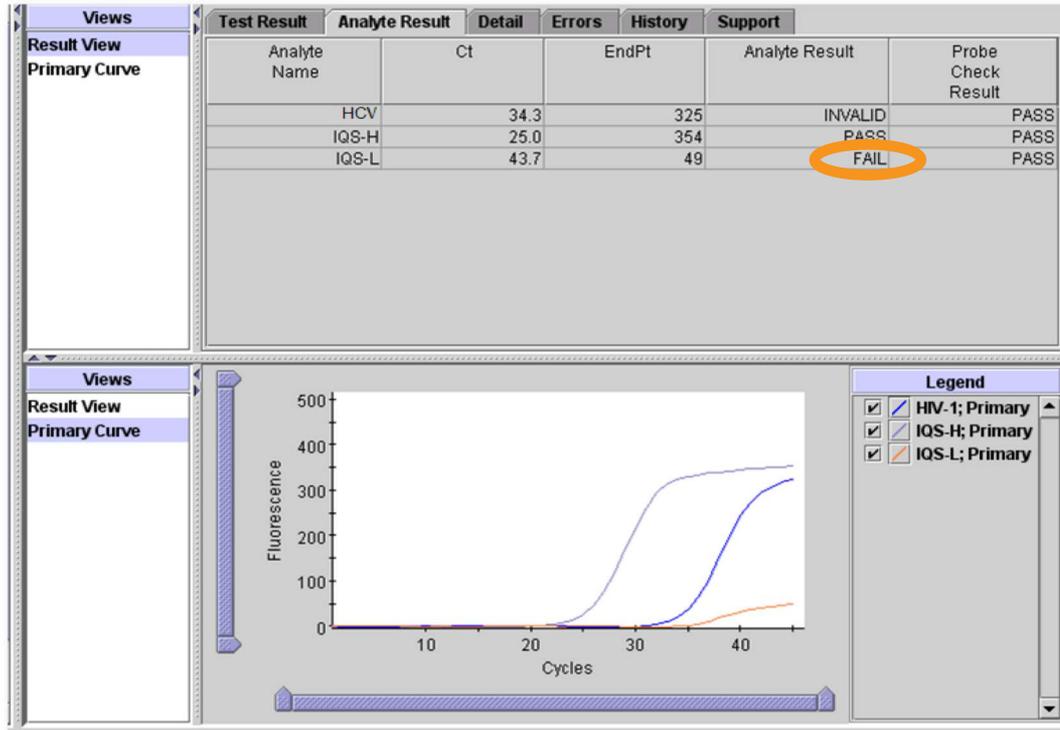
Test Result **HCV NOT DETECTED**



- No se ha detectado el HCV diana
- IQS-H: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-H tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- IQS-L: SUPERADO (PASS)
 - El IQS-L tiene un valor de Ct dentro del rango válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

Resultado NO VÁLIDO (INVALID)

Test Result INVALID



- No puede determinarse la presencia o ausencia de ARN del HCV
- IQS-H y/o IQS-L: NO SUPERADO (FAIL)
 - Los umbrales de ciclo (Ct) de los controles cuantitativos internos no están dentro del intervalo válido.
 - El punto extremo está por debajo del mínimo configurado.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS)

Patient Trend Report (Informe de tendencias del paciente)

- Puede consultar los datos de un paciente específico durante un periodo de tiempo creando un informe de tendencias

1 Seleccione Reports (Informes) y Patient Trend Report (Informe de tendencias del paciente)



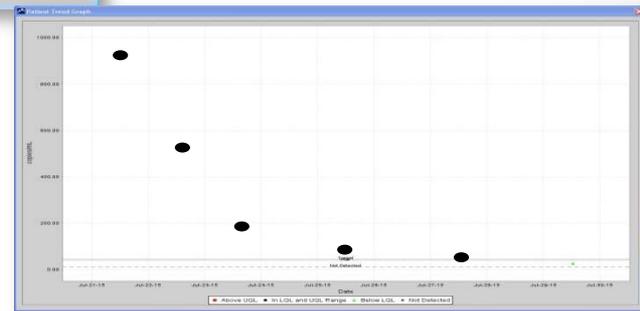
2 Elija

- Intervalo de tiempo
- Id. paciente (Patient ID)
- Ensayo (Assay)
- Preferencias de la diana

A screenshot of the 'Patient Trend Report' configuration window. It contains several input fields and checkboxes. The 'Date' section has 'All' selected. The 'Patient ID' field contains 'Bob'. The 'Assay' dropdown is set to 'Xpert HCV Viral Load'. The 'Show target reference line at' field is '35 IU/mL'. The 'Specify y-axis maximum value' checkbox is checked with a value of '750 IU/mL'. The 'Plot quantitative value in log format' checkbox is also checked. A 'View Graph' button is visible. At the bottom, there are buttons for 'Generate Report File', 'Preview PDF' (highlighted with an orange box), and 'Close'.

4 Vea una vista previa del informe

5 Vea el informe



Resolución de problemas



Factores que afectan negativamente a los resultados

- Recogida inadecuada de muestras
 - No se ha determinado el rendimiento logrado con otros dispositivos de recogida y con otros tipos de muestra
- Transporte o conservación inadecuados de la muestra recogida
 - Las condiciones de conservación y transporte son específicas de cada tipo de muestra
 - Consulte las instrucciones del prospecto para la manipulación adecuada
- Procedimiento inadecuado de realización de la prueba
 - La modificación de los procedimientos de realización de la prueba puede afectar a la eficacia diagnóstica de esta
 - Para evitar resultados erróneos es necesario seguir estrictamente las instrucciones del prospecto

Errores 2096/2097

- **La adecuación del volumen de la muestra (SVA) verifica que se haya añadido el volumen correcto de muestra al cartucho**

#	Description	Detail
1	Operation terminated	Error 2097: Assay-Specific Termination Error #2: 46, 29, 1, 0

Código del error	Motivo	Solución
2096	No se añadió muestra	Asegúrese de que la muestra se añadió al cartucho.
2097	No se añadió suficiente muestra	Asegúrese de que se añadió el volumen de muestra mínimo al cartucho.

SIN RESULTADO (NO RESULT)

NO RESULT

The screenshot displays the software interface for the Xpert HCV Viral Load 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 HCV Viral Load' 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 labeled 'For In Vitro Diagnostic Use Only.' and at the bottom, the text '<No Data Available>' is displayed.

- No puede determinarse la presencia o ausencia de HCV
- SIN RESULTADO (NO RESULT) indica que no se han recogido suficientes datos
- IQS-H o IQS-L: SIN RESULTADO (NO RESULT)
- Comprobación de la sonda: N/A (NA) (no aplicable)

- **Causa**
 - La prueba se detuvo con el botón «Detener la prueba» (Stop test)
 - Fallo eléctrico

- **Solución**
 - Asegure la alimentación
 - Repita la prueba con un cartucho nuevo

Interferencias con el Xpert® HCV Viral Load

- **Sustancias potencialmente interferentes**

- Se evaluó un total de 5 sustancias endógenas
- Se demostró que las altas concentraciones de esas sustancias endógenas **no afectan** a la especificidad del ensayo ni interfieren en la detección de HCV VL

Sustancia	Concentración analizada
Albúmina	9 g/dl
Bilirrubina	20 mg/dl
Hemoglobina	500 mg/dl
ADN humano	0,4 mg/dl
Triglicéridos	3000 mg/dl

- Se ha observado que los componentes farmacológicos siguientes **no interfieren en la cuantificación** ni en la especificidad del ensayo Xpert HCV VL

Grupo	Fármacos
Control	N/A
1	Zidovudina, saquinavir, ritonavir, interferón alfa-2b, claritromicina
2	Sulfato de abacavir, fosamperavir cálcico, interferón pegilado 2b, ribavirina
2	Fumarato de tenofovir disoproxilol, lamivudina (3TC), sulfato de indinavir, ganciclovir, clorhidrato de valganciclovir. Aciclovir
4	Estavudina (d4T), efavirenz, lopinavir, enfuvirtida (T-20), ciprofloxacino
5	Nevirapina, nelfinavir mesilato, azitromicina, clorhidrato de valaciclovir

Procedimiento de repetición de la prueba

1



Deseche el cartucho usado

Siga las directrices de seguridad del centro para la eliminación de los cartuchos

2



Obtenga la muestra residual, mezcle conforme al prospecto

Si el volumen de muestra restante es insuficiente o si la repetición de la prueba sigue indicando NO VÁLIDO (INVALID), ERROR o SIN RESULTADO (NO RESULT), obtenga una muestra nueva

3



Obtenga un nuevo cartucho

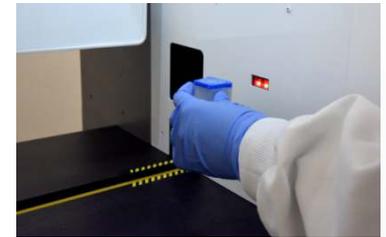
Etiquete adecuadamente como nueva prueba en el nuevo cartucho

Procese la muestra conforme al prospecto.

4



Ejecute la prueba en el sistema.



Asistencia técnica

- Antes de ponerse en contacto con el servicio técnico de Cepheid, reúna la información siguiente:
 - Nombre del producto
 - Número de lote
 - Número de serie del sistema
 - Mensajes de error (si los hubiera)
 - Versión de software y, si corresponde, «Service Tag» (número de servicio técnico) del ordenador.
- Presente su queja en línea utilizando el siguiente enlace <http://www.cepheid.com/us/support> : *Crear un Support Case (Caso de servicio técnico)*

Región	Teléfono	Correo electrónico del servicio técnico
EE. UU.	+ 1 888 838 3222	techsupport@cepheid.com
Australia y Nueva Zelanda	+ 1800 107 884 (AU) + 0800 001 028 (NZ)	techsupportANZ@cepheid.com
Brasil y Latinoamérica	+ 55 11 3524 8373	latamsupport@cepheid.com
China	+ 86 021 5406 5387	techsupportchina@cepheid.com
Francia	+ 33 563 825 319	support@cepheideurope.com
Alemania	+ 49 69 710 480 480	support@cepheideurope.com
India, Bangladesh, Bután, Nepal y Sri Lanka	+ 91 11 48353010	techsupportindia@cepheid.com
Italia	+ 39 800 902 567	support@cepheideurope.com
Japón	+ 0120 95 4886	support@japan.cepheid.com
Sudáfrica	+ 27 861 22 76 35	support@cepheideurope.com
Reino Unido	+ 44 3303 332 533	support@cepheideurope.com
Bélgica y Países Bajos	+33 563 825 3319	support@cepheideurope.com
Otros países europeos, de Oriente Próximo y africanos	+ 33 563 825 319 + 971 4 253 3218	support@cepheideurope.com

Muchas gracias.



www.Cepheid.com

