

Formazione tecnica sul saggio Xpert[®] HCV Viral Load

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

Centro di formazione Cepheid



Programma di formazione

- **Xpert® HCV Viral Load**
 - Utilità clinica
 - Reagenti
 - Prelievo del campione
 - 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[®] HCV Viral Load e i kit di prelievo dei campioni
 - Seguire le adeguate precauzioni di sicurezza del laboratorio
 - Prelevare e trasportare i campioni di analisi adeguati
 - Preparare una cartuccia ed eseguire il saggio
 - Refertare i vari risultati generati dal software
 - Comprendere la strategia di controllo del saggio

La soluzione Cepheid



- Rileva e quantifica il bersaglio
 - RNA dell'HCV
 - Risultati entro un intervallo di linearità da 10 a 100.000.000 IU/ml
- Controlli interni a bordo per ciascun campione
 - Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)
 - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
 - Standard quantitativi interni IQS-H e IQS-L
- I risultati saranno disponibili approssimativamente in
 - 105 minuti
- Sistema della cartuccia a circuito chiuso per ridurre al minimo il rischio di contaminazione
- Risultati on-demand 24 ore al giorno, 7 giorni su 7
- Accesso casuale

Uso previsto

- Il saggio Xpert® HCV VL, eseguito sui sistemi di strumentazione GeneXpert®, è previsto per la determinazione quantitativa rapida dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV) nel siero o nel plasma umano (EDTA) prelevati da individui infetti da HCV. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi transcriptasi inversa (RT-PCR) automatizzata e usa la fluorescenza per rilevare l'RNA di interesse per la determinazione quantitativa dell'HCV.
- Il saggio Xpert HCV VL quantifica i genotipi HCV 1-6 nell'intervallo da 10 a 100.000.000 IU/ml.
- Il saggio Xpert HCV VL è previsto per l'utilizzo come ausilio nella gestione dei pazienti infetti da HCV sottoposti a terapia antivirale.
- Il test misura i livelli di RNA dell'HCV al basale e durante il trattamento, e può essere utilizzato per prevedere la risposta virologica sostenuta e quella non sostenuta alla terapia contro l'HCV.

Uso previsto - Osservazioni

- I risultati ottenuti con il saggio Xpert HCV VL possono essere utilizzati anche per **confermare l'infezione da HCV nei soggetti anti-HCV positivi**. Nei soggetti anti-HCV positivi che risultano negativi all'RNA dell'HCV, si può prendere in considerazione l'uso di un altro saggio per gli anticorpi dell'HCV, in modo da distinguere tra la reale esposizione all'HCV e la falsa positività biologica.
- Può essere indicato **ripetere il test dell'RNA dell'HCV** se il soggetto è stato esposto all'HCV negli ultimi 6 mesi o in caso di evidenza clinica di malattia da HCV.
- Il saggio **non** è destinato ad essere utilizzato come test di screening dell'HCV per i donatori.

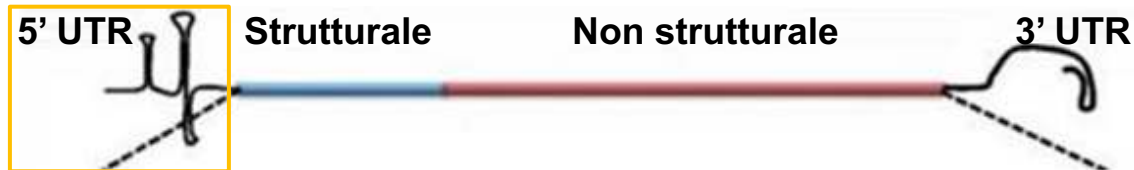
Bersagli e sonde

Bersagli

- Standard quantitativi interni IQS-H e IQS-L
- La regione più conservata del genoma RNA dell'HCV

Sonde

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



Requisiti del saggio Xpert® HCV Viral Load

Sistemi GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **versione 4.7b** o successiva
- Software Xpertise **versione 6.4b** o successiva

Kit per i test (CE-IVD)

- GXHCV-VL-CE-10

Prelievo del campione

- Campioni di sangue intero raccolti in provette di raccolta con EDTA-K2, EDTA-PPT o siero

Altri materiali

- Attrezzatura di protezione personale (PPE)
- Candeggina 1:10
- Etanolo al 70% o etanolo denaturato al 70%
- Miscelatore vortex
- Centrifuga per la preparazione del plasma

Facoltativo

- Gruppo di continuità/dispositivo di protezione da sovratensioni
- Stampante

Buona prassi di laboratorio

Dispositivi di protezione individuale (DPI)

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

Banco di laboratorio dedicato

- Pulire regolarmente le superfici di lavoro con:
 - ✓ Candeggina per uso domestico con diluizione 1:10
 - ✓ Soluzione di etanolo al 70%
- Dopo la pulizia, assicurarsi che le superfici di lavoro siano asciutte

Conservazione dei campioni di analisi, dei campioni e dei kit

- Conservare i campioni di analisi e i campioni lontano dal kit in modo da prevenirne la contaminazione

Apparecchiature

- Usare puntali con filtro, laddove consigliato
- Seguire i requisiti del produttore in merito alla calibrazione e alla manutenzione delle apparecchiature

Manipolazione del kit



Contenuto del kit Xpert® HCV Viral Load

Numero di catalogo	GXHCV-VL-CE-10
Cartucce per kit	10
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 (1 ml)
Conservazione	2-28 °C



Le cartucce contengono sostanze chimiche pericolose. Per ulteriori informazioni, consultare il foglietto illustrativo e la scheda dati di sicurezza.

Conservazione e manipolazione del kit del saggio Xpert HCV Viral Load

- Conservare le cartucce e i reagenti del saggio HCV VL a una temperatura compresa tra **2 °C e 28 °C**
- 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 saggio solo quando si aggiunge il campione, chiudere il coperchio e procedere con il trattamento



Avvertenze e precauzioni

- Non agitare la cartuccia
- Non usare una cartuccia che...
 - appare bagnata, presenta perdite o se la guarnizione del coperchio sembra essere rotta
 - appare danneggiata
 - è caduta dopo essere stata estratta dalla confezione
 - è caduta o è stata agitata dopo l'aggiunta del 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



Avvertenze e precauzioni

- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard.
- Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali.
- Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.

Limitazioni del saggio Xpert® HCV Viral Load

- Il saggio non è destinato ad essere utilizzato come **test di screening per i donatori**
- Le prestazioni del saggio Xpert HCV VL non sono state accertate con campioni di analisi diversi da quelli validati, ovvero **plasma e siero**
- Le prestazioni del test Xpert HCV VL non sono state valutate per campioni di analisi trattati con metodi diversi da quelli descritti nel foglietto illustrativo
- La mancata osservanza delle procedure di analisi può portare a risultati errati
- Gli inibitori presenti nei campioni possono generare risultati non validi

Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi



Raccolta del campione per il saggio Xpert® HCV Viral Load

- **Sangue intero**

- Prelevare i campioni di sangue intero in provette con EDTA, EDTA-PPT o siero secondo le istruzioni del produttore

Provetta con EDTA



Provetta con siero

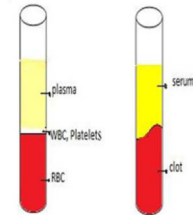


Provetta con eparina




- **Plasma/Siero**


- Centrifugare per separare il plasma/siero dai globuli rossi secondo le istruzioni del produttore
- Preparare come minimo 1,2 ml di plasma/siero



Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

	Prima di eseguire il test	Temperatura (°C)	Durata della conservazione
	Sangue intero anticoagulato in EDTA	+15 / +35 °C	24 ore
		+2 / +8 °C	72 ore

I campioni di plasma sono stabili per un massimo di tre cicli di congelamento/scongelo.

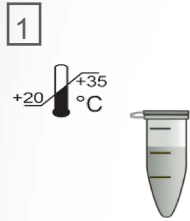
	Prima di eseguire il test	Temperatura (°C)	Durata della conservazione
	Plasma e siero	+15 / +35 °C	24 ore
		+2 / +8 °C	3 giorni
		-70 / -18 °C	6 settimane

Preparazione della cartuccia

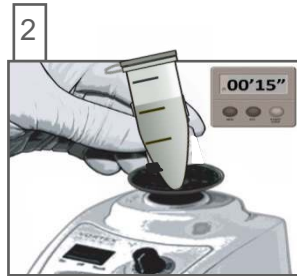


Preparazione della cartuccia Xpert[®] HCV VL

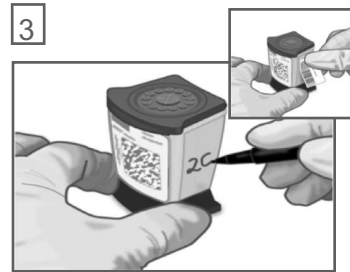
Campione di analisi: plasma/siero



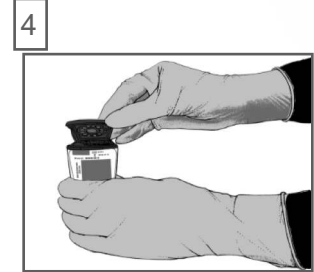
Se si utilizzano campioni congelati o refrigerati, lasciarli completamente scongelare ed equilibrare a temperatura ambiente



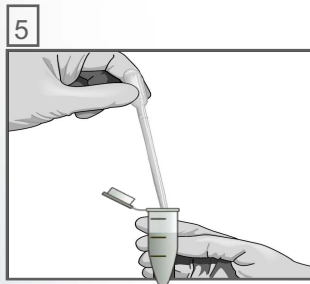
Agitare mediante vortex il campione equilibrato per 15 secondi. Se il campione di analisi è torbido, centrifugarlo per alcuni secondi



Applicare sul lato della cartuccia un'etichetta con l'ID del campione



Aprire il coperchio della cartuccia



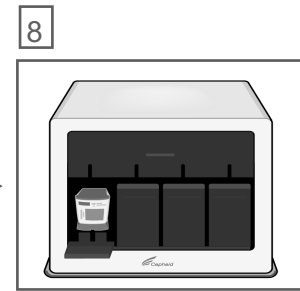
Pipettare almeno 1 ml di campione utilizzando la pipetta in dotazione*



Svuotare lentamente la pipetta nella camera per il campione della cartuccia



Chiudere bene il coperchio. Iniziare il test entro l'intervallo di tempo specificato nel foglietto illustrativo



Avviare il test con lo strumento GeneXpert



*Pipetta di trasferimento del saggio HCV VL

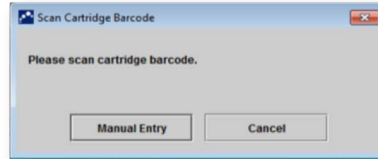
Esecuzione di un'analisi

1 Creare il test

GeneXpert

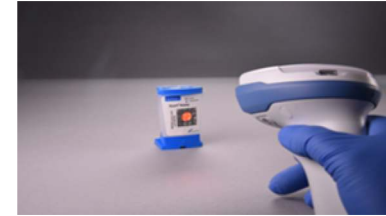


2 Messaggi sulla scansione del codice a barre:
Cartuccia/ ID del paziente e/o ID del campione

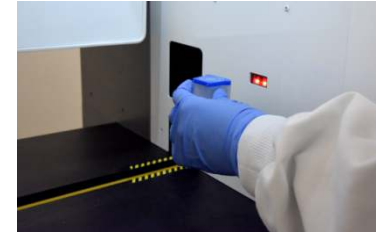
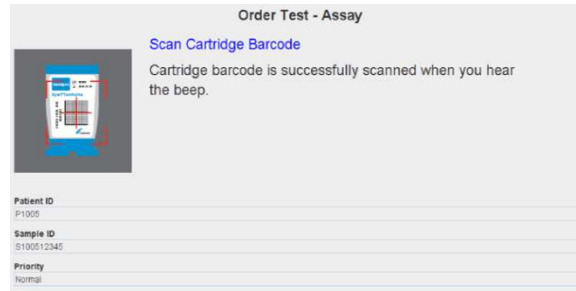


Per impostazione predefinita, non fare clic su Immissione manuale (Manual Entry) o Annulla (Cancel)

3 Eseguire la scansione della cartuccia



GeneXpert
Infinity



Per i dettagli completi su come eseguire un test, consultare il foglietto illustrativo e i manuali dell'operatore GeneXpert Dx o Xpertise Dx.

Creare un test sul software GeneXpert Dx

4 Compilare i campi come richiesto

5 Il protocollo del saggio viene selezionato automaticamente

6 Il modulo viene selezionato automaticamente
NON MODIFICARLO!!!

7 Fare clic su Avvia analisi (Start test)

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

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 Barcode



Per creare un test sul software Xpertise Dx

4 Compilare i campi come richiesto

Order Test - Test Information

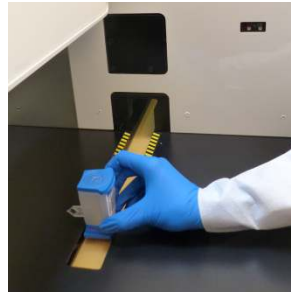
Patient ID patientid	
Sample ID sampleid	
Last Name patient	First Name id
Assay* Xpert HCV Viral Load	
Reagent Lot ID* 12102	Cartridge S/N* 282769448
Expiration Date* 2018/11/04	Priority Normal
Test Type Specimen	Other Sample Type
Sample Type Other	
Notes	

5 Il protocollo del Assay Name viene selezionato automaticamente

6 Fare clic su INVIA (SUBMIT)



7 Posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore



Protocollo automatizzato Xpert



Controlli qualità



- **Controlli qualità Xpert HCV VL**
 - 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
 - Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)
 - Controlli per la verifica della sonda (PCC)
 - Standard quantitativi interni IQS-L e IQS-H per la quantificazione del virus nell'RNA dell'HCV

Controlli di qualità interni

- **Adeguatezza del volume dei campioni (SVA)**
 - Assicura che il volume corretto del campione sia stato aggiunto nella cartuccia
- **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 microsferi
 - integrità delle sonde
 - riempimento della provetta di reazione
 - stabilità del colorante
- **Standard quantitativo interno alto e basso (IQS-H e IQS-L)**
 - Chiamati IQS Low (10^3 copie/ml) e IQS High (10^6 copie/ml)
 - 2 complessi Armored RNA® non infettivi
 - Assicura che il campione sia stato analizzato correttamente
 - Rilevamento dell'inibizione della reazione RT-PCR associata al campione di analisi e presenza di microrganismi
 - I valori di fluorescenza e Ct devono essere sempre compresi nell'intervallo valido

Controlli esterni disponibili in commercio

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

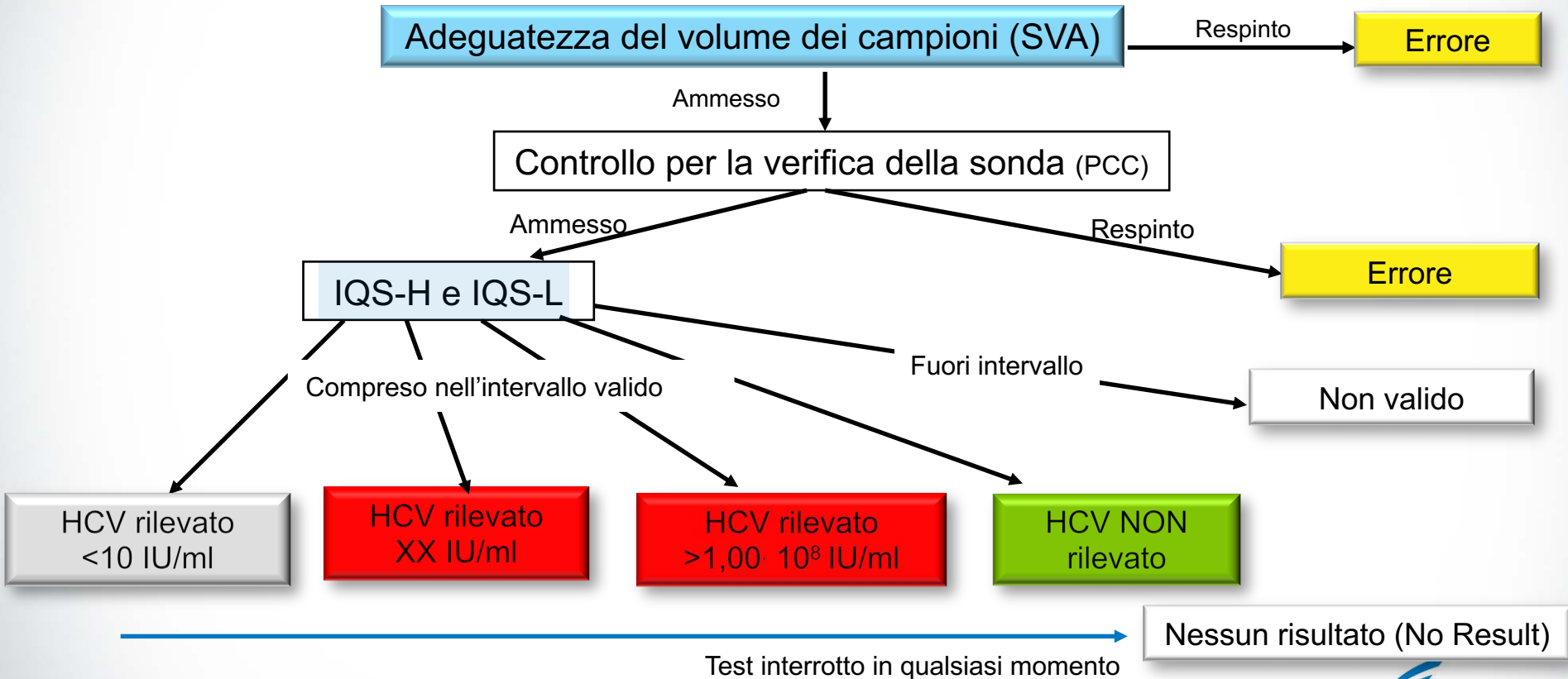
Codice prodotto	Descrizione	Configurazione	Conservazione
963003	Positivo per HCV Controllo alto	1,2 ml	- 70 °C
963002	Positivo per HCV Controllo intermedio	1,2 ml	- 70 °C

- Oltre a quello indicato sopra, esistono 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.

Interpretazione dei risultati



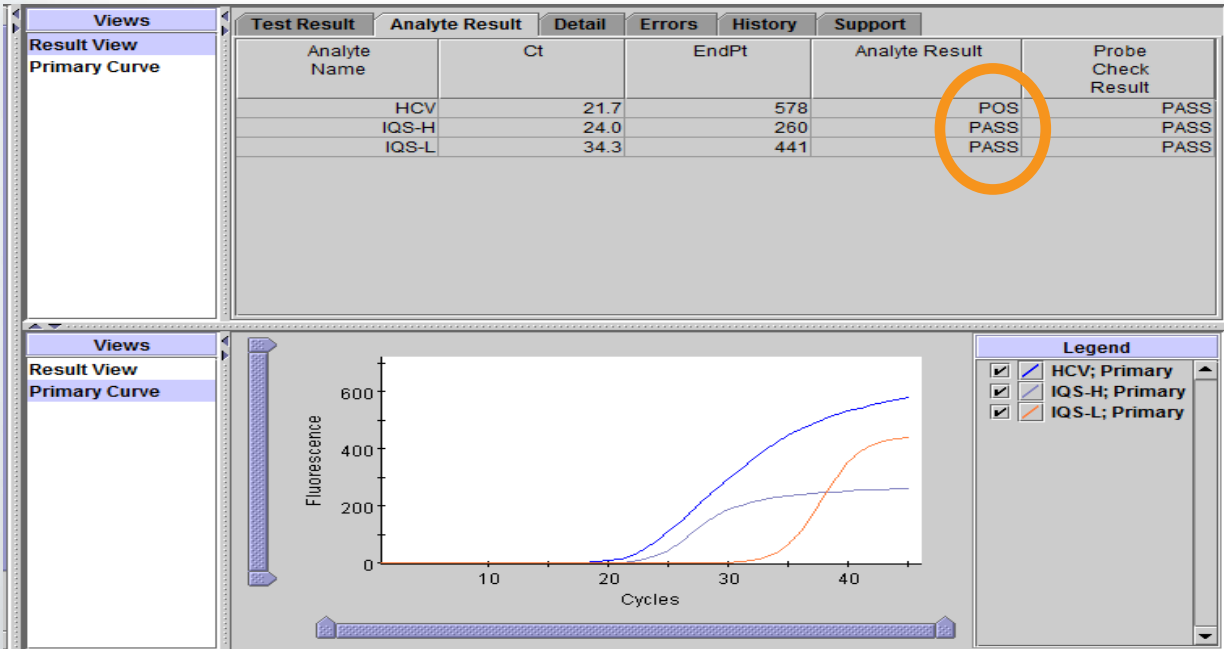
Algoritmo di interpretazione dei risultati



HCV RILEVATO xx IU/ml

Test Result **HCV DETECTED**

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



- Il bersaglio HCV è rilevato a un valore quantitativo
 - L'RNA dell'HCV presenta un titolo entro l'intervallo di linearità impostato per il saggio e un endpoint al di sopra del valore minimo
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

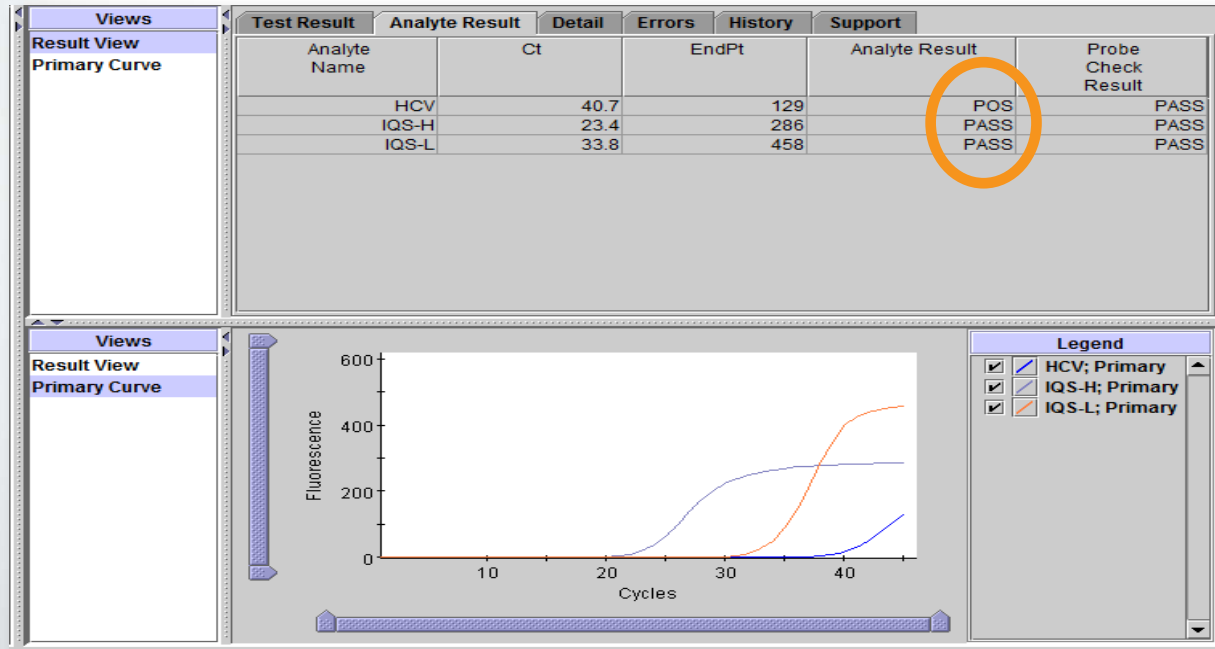
Calcolo di esempio:

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

HCV RILEVATO <10 IU/ml

Test Result HCV DETECTED

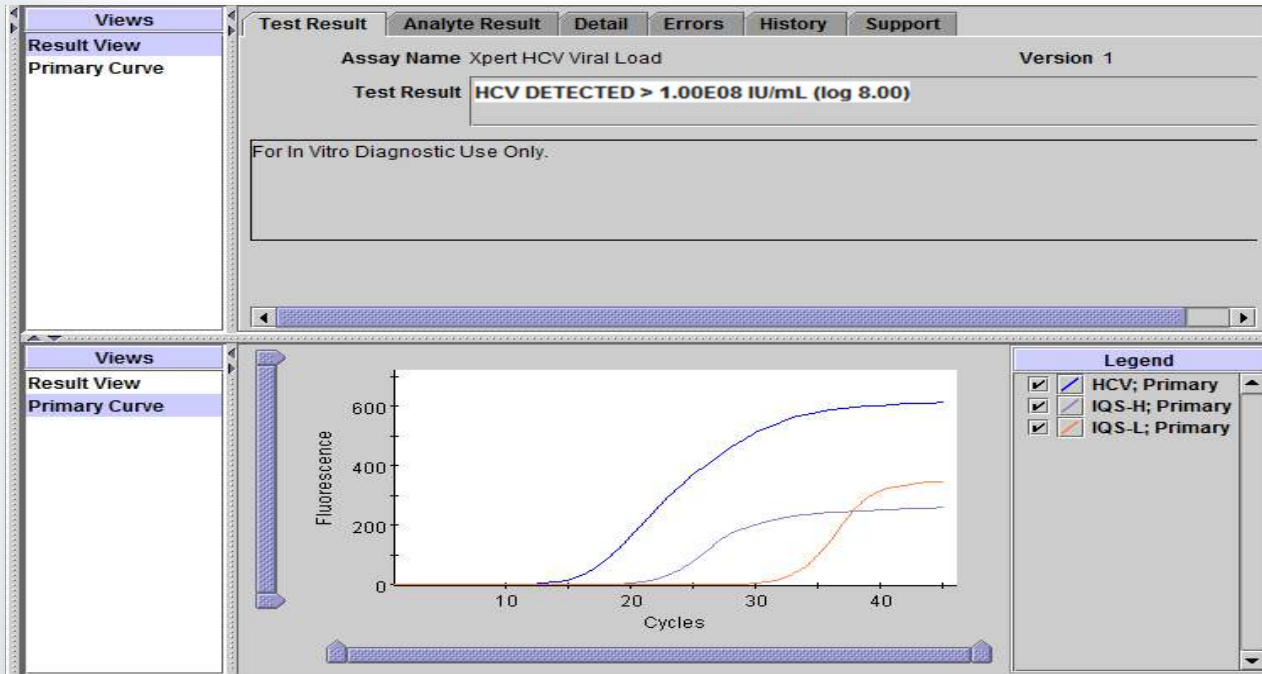
Test Result HCV DETECTED < 10 IU/mL (log 1.00)



- L'HCV bersaglio è rilevato al di sotto dell'intervallo quantitativo del saggio
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

HCV RILEVATO $> 1 \times 10^8$ IU/ml

Test Result **HCV DETECTED**



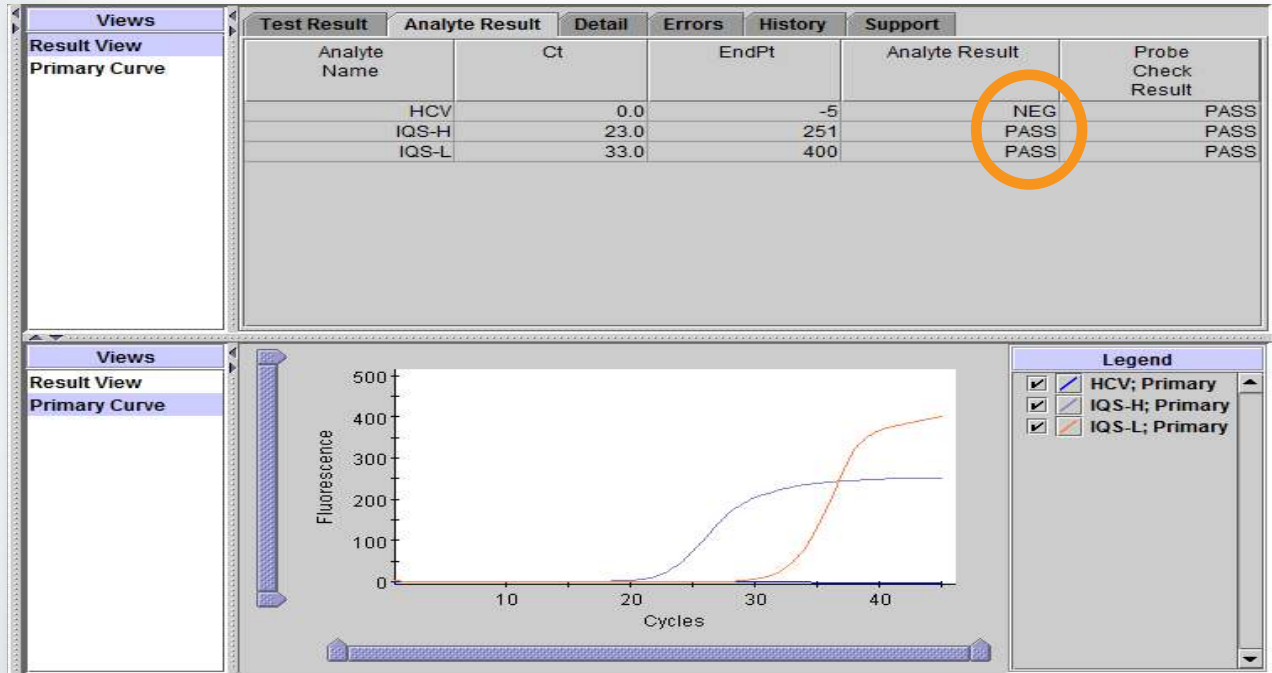
- L'HCV bersaglio è rilevato al di sopra dell'intervallo quantitativo del saggio
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

Calcolo di esempio:

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

HCV NON RILEVATO (HCV NOT DETECTED)

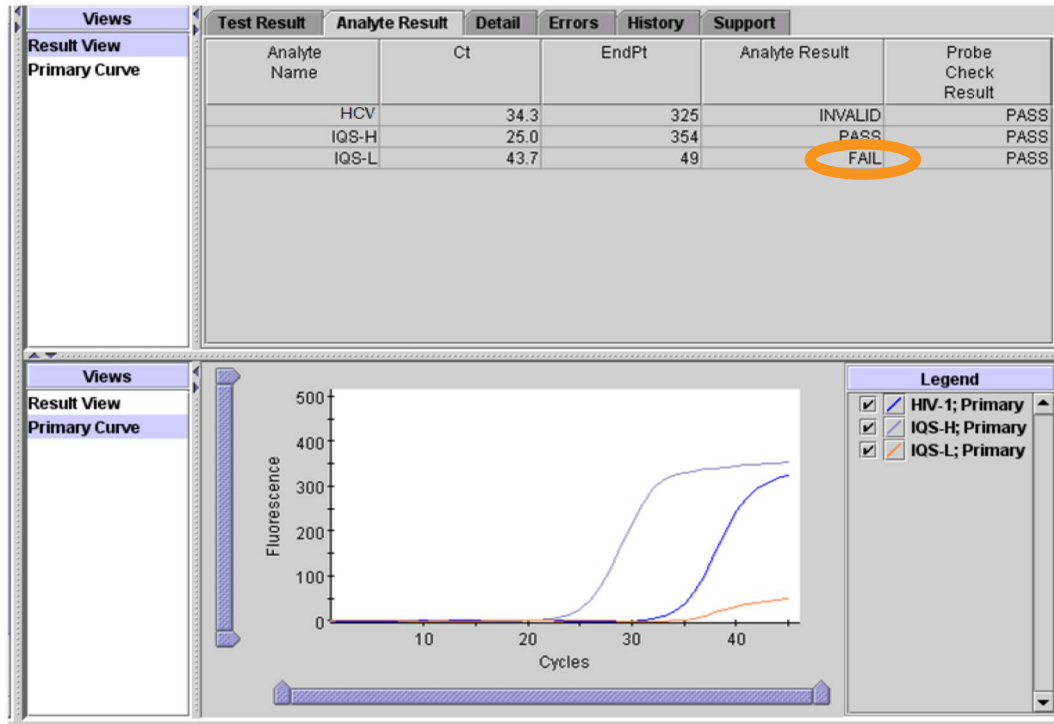
Test Result **HCV NOT DETECTED**



- L'HCV bersaglio non è stato rilevato
- IQS-H: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-H ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- IQS-L: AMMESSO (PASS)
 - L'IQS-L ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

Risultato NON VALIDO (INVALID)

Test Result INVALID



- Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'RNA dell'HCV
- IQS-H e/o IQS-L: RESPINTO (FAIL)
 - Le soglie del ciclo del controllo quantitativo interno non rientrano nell'intervallo valido
 - L'endpoint è al di sotto del valore minimo impostato
- Verifica della sonda: AMMESSO (PASS)

Patient Trend Report (Rapporto sull'andamento dei pazienti)

- È possibile monitorare uno specifico paziente durante uno specifico arco di tempo creando un rapporto delle tendenze

1 Selezionare Rapporti (Reports) e Rapporto delle tendenze del paziente (Patient Trend Report)



2 Selezionare

- Intervallo di tempo
- ID paziente (Patient ID)
- Saggio
- Preferenze per il bersaglio

Date

All
 Select From MM/DD/YY To MM/DD/YY

Patient ID: Bob

Assay: Xpert HCV Viral Load Version: 1

Show target reference line at: 35 IU/mL

Specify y-axis maximum value: 750 IU/mL

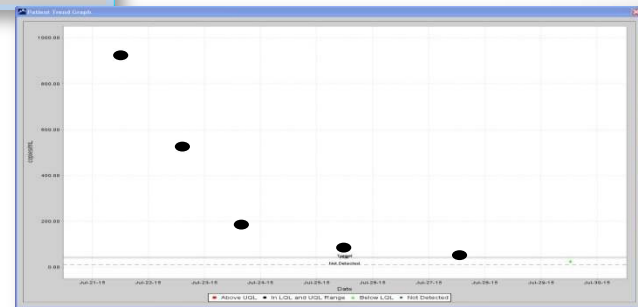
Plot quantitative value in log format

View Graph

Generate Report File Preview PDF Close

4 Visualizzare in anteprima il rapporto

5 Visualizzare il rapporto



Risoluzione dei problemi

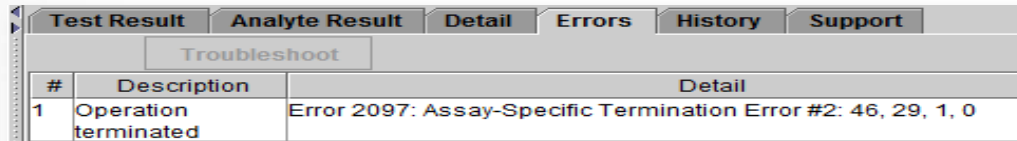


Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- 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
 - Le condizioni di conservazione e trasporto sono specifiche per i campioni di analisi
 - Per le istruzioni sulla corretta manipolazione, consultare il 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 erranei

Errori 2096/2097

- **L'Adeguatezza del volume del campione (Sample Volume Adequacy, SVA) verifica che il volume corretto di campione sia stato aggiunto alla cartuccia**



The screenshot shows a software interface with a 'Troubleshoot' tab selected. Below the tab is a table with the following content:

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

Codice di errore	Motivo	Soluzione
2096	Non è stato aggiunto alcun campione	Assicurarsi che il campione venga aggiunto nella cartuccia
2097	Il campione aggiunto è insufficiente	Assicurarsi che il volume di campione minimo richiesto venga aggiunto nella cartuccia

NESSUN RISULTATO (NO RESULT)

NO RESULT

The screenshot shows a software interface with a top navigation bar containing 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 displays 'NO RESULT' in a blue-bordered box. Below this, there is a large empty grey area. At the bottom of the interface, the text '<No Data Available>' is displayed.

- Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di HCV
- NESSUN RISULTATO (NO RESULT) indica che i dati raccolti sono insufficienti
- IQS-H o IQS-L: NESSUN RISULTATO (NO RESULT)
- Verifica della sonda: NA (non applicabile)

- **Causa**
 - Il test è stato interrotto con il pulsante di arresto del test
 - Guasto elettrico

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

Interferenza con il saggio Xpert® HCV Viral Load

- **Sostanze potenzialmente interferenti**

- Complessivamente sono state valutate 5 sostanze endogene
- È stato dimostrato che la presenza di queste sostanze endogene a livelli elevati **non influisce** sulla specificità del saggio, né interferisce con il rilevamento dell'HCV VL

Sostanza	Concentrazione analizzata
Albumina	9 g/dl
Bilirubina	20 mg/dl
Emoglobina	500 mg/dl
DNA umano	0,4 mg/dl
Trigliceridi	3000 mg/dl

- È stato dimostrato che le sostanze farmaceutiche sotto elencate **non interferiscono con la quantificazione** né con la specificità del saggio Xpert HCV VL

Pool	Farmaci
Controllo	N/A
1	Zidovudina, Saguinavir, Ritonavir, Interferone alfa-2b, Claritromicina
2	Abacavir solfato, Fosamprenavir sale di calcio, Peginterferone 2b, Ribavirina
2	Tenofovir disoproxil fumarato, Lamivudina (3TC), Indinavir solfato, Ganciclovir, Valganciclovir HCl, Aciclovir
4	Stavudina (d4T), Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtide (T-20), Ciprofloxacina
5	Nevirapina, Nelfinavir mesilato, Azitromicina, Valaciclovir HCl

Procedura di ripetizione del test

1



Gettare la cartuccia usata

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

2



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

3



Procurarsi una nuova cartuccia

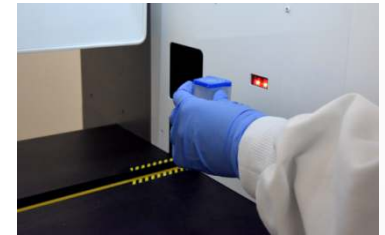
Applicare sulla nuova cartuccia l'apposita etichetta con la dicitura "Ripetizione del test"

Trattare il campione come indicato nel foglietto illustrativo

4



Eeguire il test sul sistema



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 del computer
- Registra il reclamo online utilizzando il seguente link <http://www.cepheid.com/us/support> : *Creare una richiesta di assistenza (Create a Support Case)*

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

Grazie.



www.Cepheid.com

