

# Formação técnica sobre o ensaio Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load

Apenas para utilização com CE-IVD

*Centro de formação da Cepheid*



# Agenda da formação

- **Xpert® HBV Viral Load**
  - 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 adequadamente o kit do cartucho do Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load e os kits de colheita de amostras
  - Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório
  - Colher os tipos de amostra corretos e transportá-los
  - Preparar o cartucho e executar o teste Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load
  - Compreender a estratégia de controlo do ensaio
  - Comunicar os vários resultados gerados pelo software

# A solução Cepheid



- Deteta e quantifica o alvo HBV
  - Resultados fiáveis num intervalo linear de 10 UI/ml a 1 000 000 000 UI/ml
- Controlos no sistema para cada amostra individual
  - Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)
  - Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
  - Padrões quantitativos internos (IQS — Internal Quantitative Standards) alto (H — High) e baixo (L — Low)
- Resultados em cerca de 60 minutos
- O sistema de cartucho fechado minimiza o risco de contaminação
- Resultados a pedido 24/7
- Acesso aleatório

# Utilização prevista

- O ensaio Xpert® HBV Viral Load é um teste de diagnóstico *in vitro* para a **quantificação rápida de ADN do vírus da hepatite B (HBV)** em soro ou plasma (EDTA) humanos de indivíduos com infecção crónica pelo HBV, utilizando os sistemas automatizados GeneXpert®.
- O ensaio Xpert® HBV Viral Load está validado para quantificação de ADN de HBV dos **genótipos A, B, C, D, E, F, G, H**
- O ensaio destina-se a ser utilizado em conjunto com o quadro clínico e outros marcadores laboratoriais como indicador do **prognóstico da doença** e a ser utilizado como auxiliar na avaliação da resposta viral ao tratamento antirretroviral, conforme medido por alterações nos níveis plasmáticos ou séricos de ADN do HBV.
- O teste não se destina à utilização como teste de infecção por HBV para rastreio de dadores de sangue nem como teste de diagnóstico para confirmar a presença de infecção por HBV.

# Alvos e sondas

- **Alvo**
  - ADN do HBV
  
- **Sondas**
  - 1 sonda para padrão quantitativo interno - alto
  - 1 sonda para padrão quantitativo interno - baixo
  - 1 sonda para HBV

# Requisitos do Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load

## Sistemas GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **v4.7b** ou posterior/software Infinity Dx **v6.4b** ou posterior

## Kits de teste (CE-IVD)

- GXHBV-VL-CE-10

## Colheita de amostras

- Tubos de colheita com K2-EDTA/PPT-EDTA ou de colheita de soro

## Outros materiais

- Equipamento de proteção individual (EPI)
- Lixívia a 1:10
- Etanol ou etanol desnaturado a 70%
- Centrífuga para preparação do plasma/soro

## 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 Xpert® HBV Viral Load

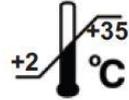
Número de catálogo	GXHBV-VL-CE-10
Testes por kit	10
CD do kit	Ficheiro de definição do ensaio (ADF — Assay Definition File)
	Instruções de importação do ensaio
	Folheto informativo (PDF)
Pipetas de transferência	10 (1 ml)
Conservação	2-35 °C



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

# Advertências e precauções

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load entre 2 °C e 35 °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 apenas para adicionar a amostra, feche a tampa e prossiga com o processamento
- Não substitua os reagentes do ensaio Xpert<sup>®</sup> HBV Viral Load por outros reagentes



# Advertências e precauções

- Não agite o cartucho
- Não utilizem 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 os reagentes do ensaio Xpert® HBV Viral Load de acordo com as orientações da sua instituição e do país relativas à eliminação de materiais com risco biológico*

# Advertências e precauções

- Amostras biológicas, dispositivos de transferência e cartuchos usados devem ser considerados como tendo potencial de transmissão de agentes infecciosos que exigem precauções padrão.
- Siga os procedimentos relativos a resíduos ambientais da vossa instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos.
- Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as diretrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).

# Limitações do ensaio Xpert<sup>®</sup> HVB Viral Load

- O desempenho do Xpert<sup>®</sup> HVB Viral Load não foi demonstrado noutras amostras além das que foram validadas, ou seja, **soro e plasma**
- O desempenho do teste Xpert<sup>®</sup> HVB Viral Load 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 amostras

- O sangue total deve ser colhido em tubos de colheita com K2-EDTA, PPT-EDTA ou tubos de colheita de soro e centrifugado para separar o plasma/soro e os glóbulos vermelhos de acordo com as instruções do fabricante.

Não utilize tubos com heparina!



- Se utilizar a **pipeta de transferência** incluída no kit, encha a pipeta até à 4.<sup>a</sup> marca (1 ml) com soro ou plasma
- Se utilizar uma **pipeta de precisão**, transfira 600 µl de plasma ou soro

# Conservação e transporte das amostras

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

As amostras de plasma/soro são estáveis até três ciclos de congelamento/descongelamento.

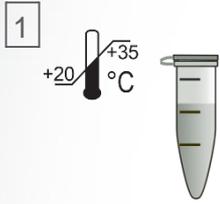


	Plasma/Soro		24 horas
			7 dias
			6 semanas

# Preparação do cartucho



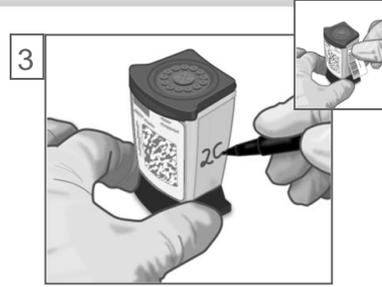
# Preparação do cartucho – Soro ou plasma



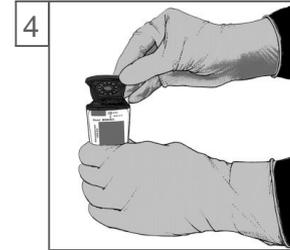
Se utilizar amostras congeladas ou refrigeradas, coloque-as à temperatura ambiente até descongelarem completamente e estejam à temperatura ambiente



Agite a amostra à temperatura ambiente num agitador de vórtice durante 15 segundos. Se a amostra estiver turva, centrifugue-a durante alguns segundos



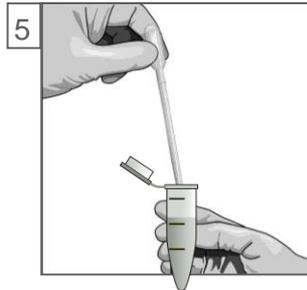
Identifique o lado do cartucho com a ID da amostra



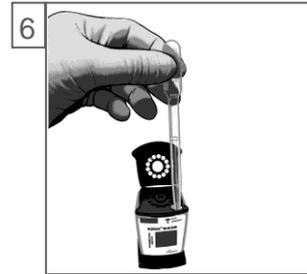
Abra a tampa do cartucho



\*Pipeta de transferência do ensaio HBV VL



Pipete um mínimo de 1 ml da amostra utilizando a pipeta fornecida\*



Esvazie lentamente a pipeta para a câmara da amostra do cartucho



Feche a tampa com firmeza

Inicie o teste no sistema GeneXpert no prazo de 4 horas

# Executar um teste

1 Criar teste

GeneXpert



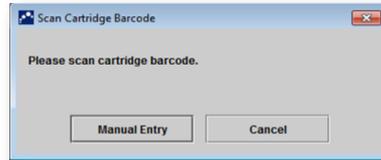
Inicie o teste dentro de **4 horas** após a adição da amostra ao cartucho

GeneXpert  
Infinity



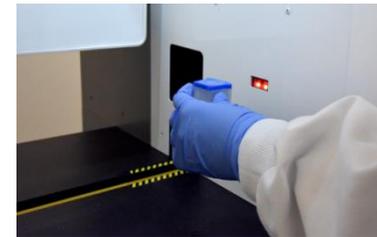
Coloque o cartucho na correia transportadora dentro de **30 minutos** após a adição da amostra.

2 Ler mensagens do 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.

# 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

The screenshot shows the 'Create Test' window with the following fields and values:

- Patient ID: [Empty]
- Sample ID: [Empty]
- Patient ID 2: [Empty]
- Last Name: [Empty]
- Name: [Empty]
- Select Assay: **Xpert HBV Viral Load**
- Select Module: A3
- Reagent Lot ID\*: 16119
- Expiration Date\*: 2016/1/17
- Test Type: Specimen
- Sample Type: Other
- Notes: [Empty]
- Buttons: **Start Test** and Scan Cartridge Barcode

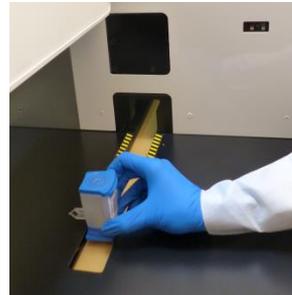


# Criar um teste no software Xpertise Dx

- 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 HBV Viral Load	
<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



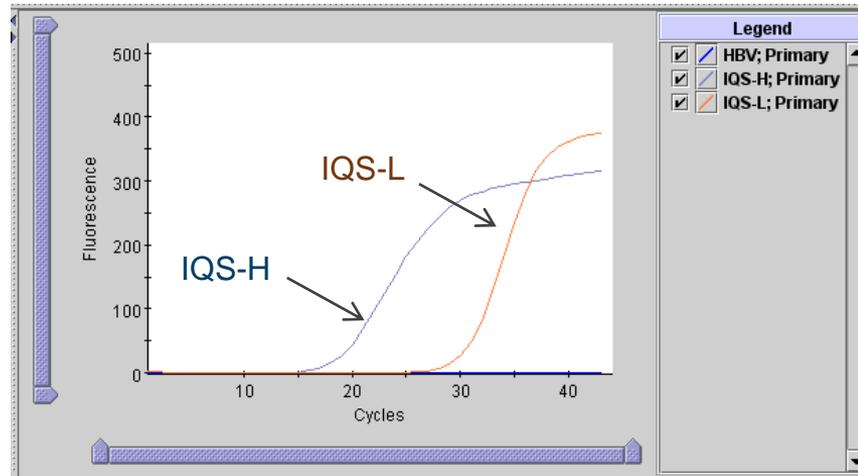
- **“Controlos de qualidade” do ensaio Xpert® HBV Viral Load**
  - Cada cartucho Xpert constitui um dispositivo de teste autónomo
  - A Cepheid concebeu métodos moleculares específicos de modo a incluir controlos internos que permitem ao sistema detetar modos de falha específicos em cada cartucho
    - Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)
    - Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
    - Padrões quantitativos internos (IQS — Internal Quantitative Standards)

# 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 para monitorizar
    - a reidratação das esferas
    - a integridade da sonda
    - o enchimento do tubo de reação
    - a estabilidade do corante
- **Padrão Quantitativo Interno Alto e Baixo (IQS-H e IQS-L)**
  - Dois plasmídeos linearizados com uma sequência não relacionada com o HBV sob a forma de uma esfera seca
  - Utilizados para calcular a concentração do ADN do HBV na amostra
  - Detetam inibição do ensaio de PCR em tempo real associada à amostra, atuam como controlo de processamento da amostra
  - Os valores de Ct e de fluorescência do IQS baixo e IQS alto têm de se situar sempre dentro o intervalo válido

# Padrões de quantificação internos (Internal Quantitation Standards, IQS)

- O IQS-H tem um valor de Ct inferior ao do IQS-L
  - IQS-H Padrão de quantificação interno alto
  - IQS-L Padrão de quantificação interno baixo



# Controlos externos disponíveis no mercado

**Thermofisher - <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product>**

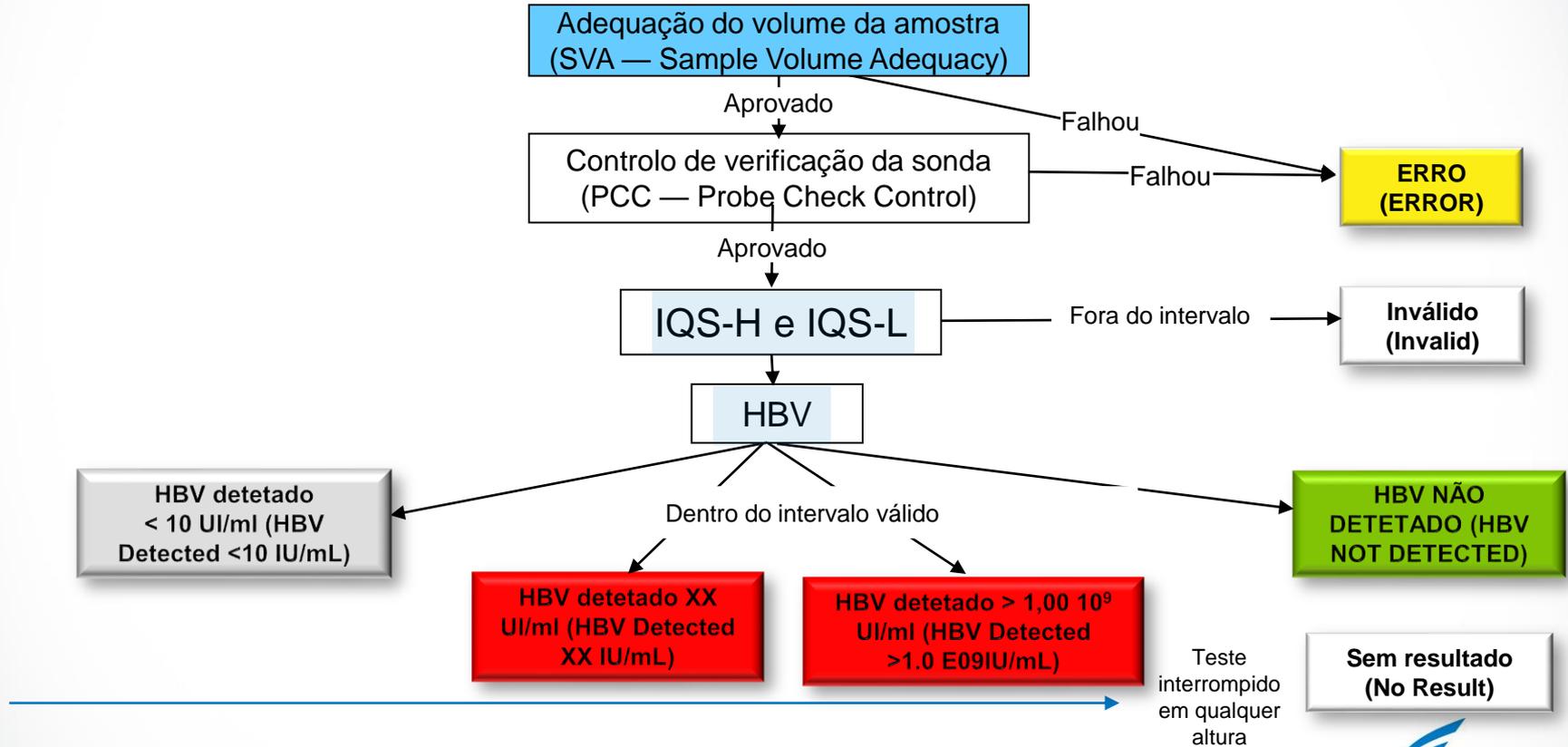
Número de referência	Descrição	Configuração	Conservação
965003	Controlo alto para HBV AcroMetrix	1 ml x 5 frascos	≤ -20 °C
965002	Controlo intermédio para HBV AcroMetrix	1 ml x 5 frascos	≤ -20 °C
965001	Controlo baixo para HBV AcroMetrix	1 ml x 5 frascos	≤ -20 °C

- *Estão igualmente disponíveis muitos outros fornecedores de material de controlo de qualidade, para além do supracitado.*
- *Devem ser utilizados controlos externos de acordo com as exigências de organizações de acreditação locais, estatais, conforme aplicável*

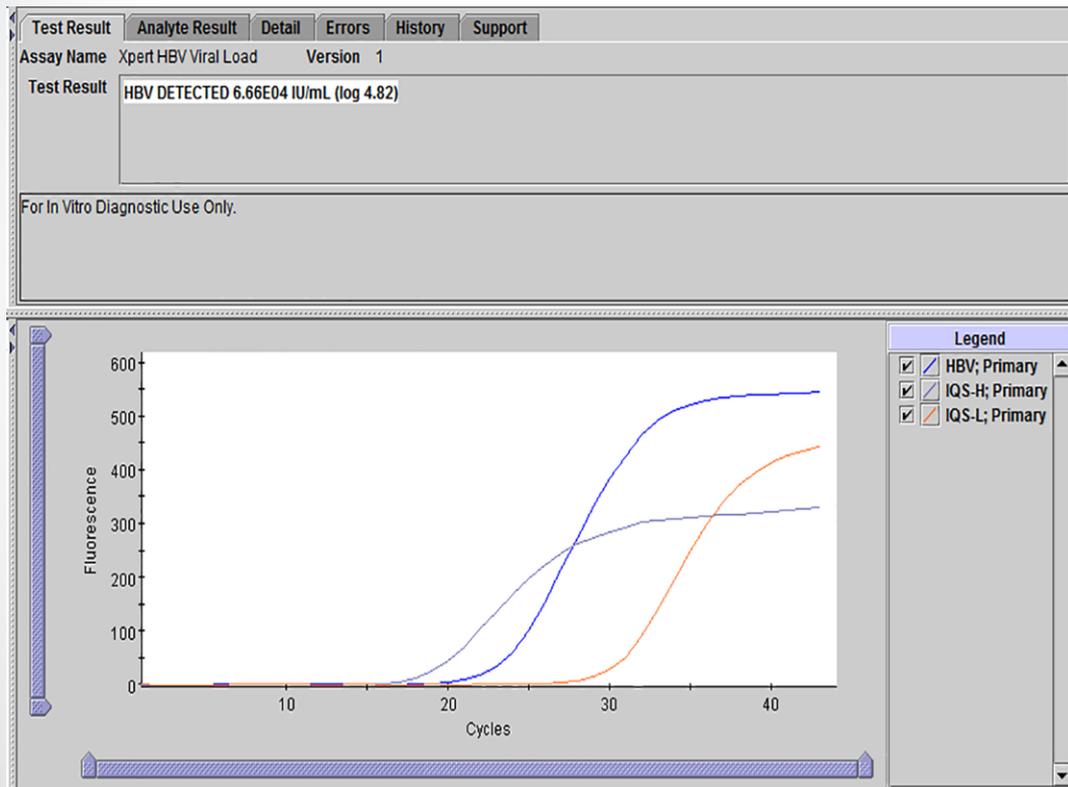
# Interpretação dos resultados



# Algoritmo de interpretação dos resultados



# HBV DETETADO 6,66 E04 UI/ml (HBV DETECTED 6.66 E04 IU/mL)

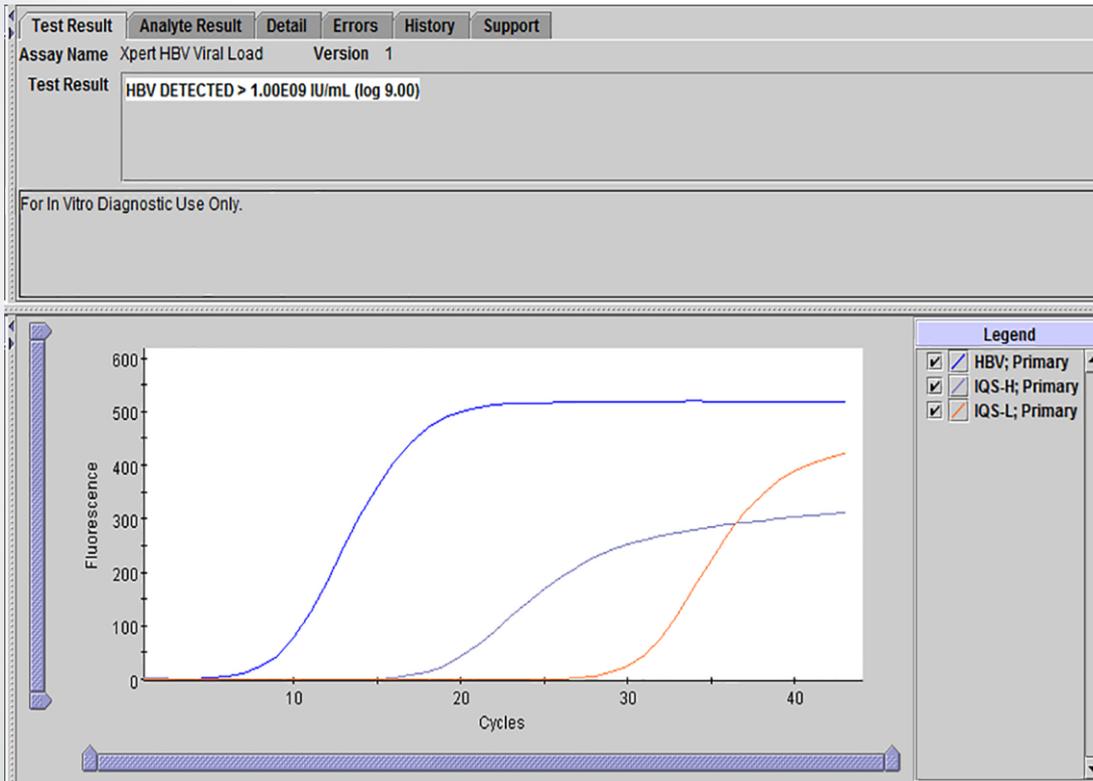


- O ADN do HBV é detetado num valor quantitativo
- IQS-H: APROVADO (PASS)
  - O IQS-H tem um Ct dentro do intervalo válido
- IQS-L: APROVADO (PASS)
  - O IQS-L tem um Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

**Exemplo de cálculo:**

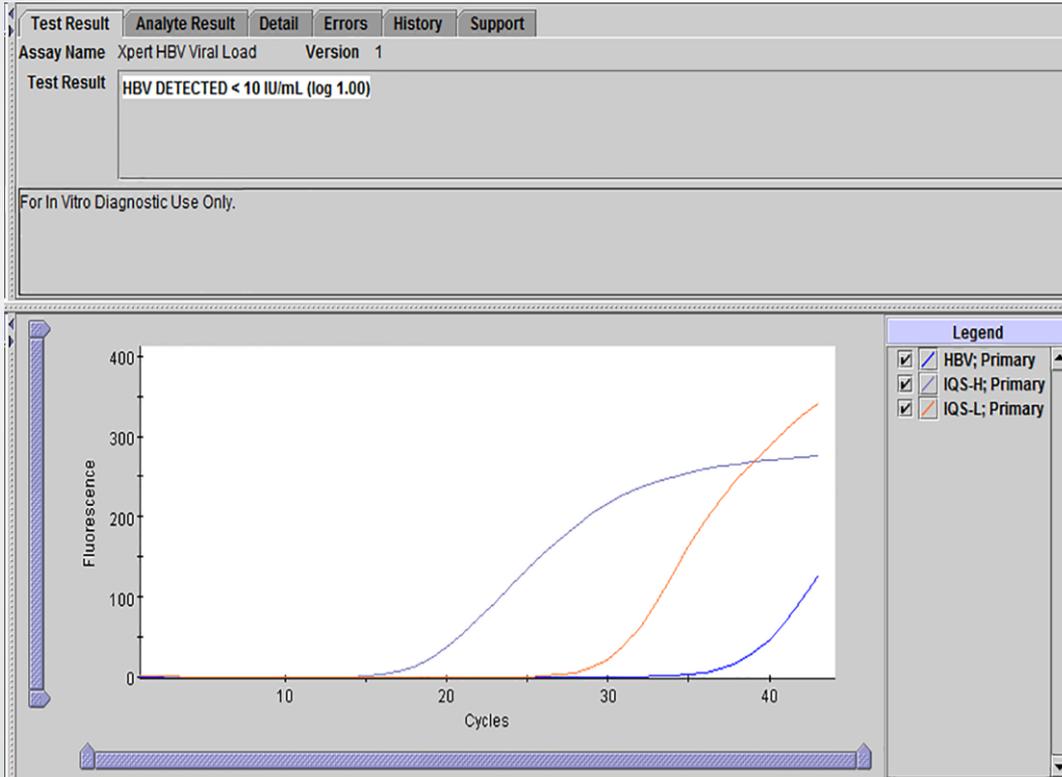
$$6,66E04 = 6,66 \times 10^4 = 66\,600 \text{ UI/ml}$$

# HBV DETETADO >1,00E09 UI/ml (HBV DETECTED >1.00E09 IU/mL)



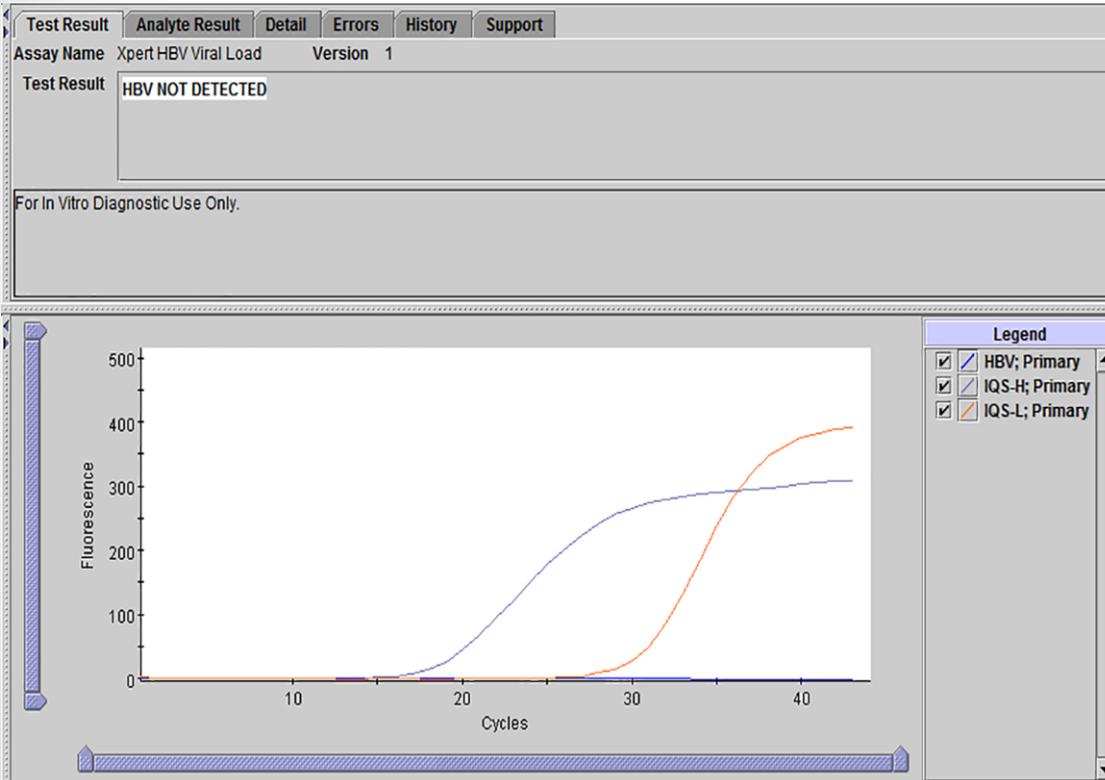
- O ADN do HBV foi detetado acima do intervalo quantitativo do ensaio
- IQS-H: APROVADO (PASS)
  - O IQS-H tem um Ct dentro do intervalo válido
- IQS-L: APROVADO (PASS)
  - O IQS-L tem um Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

# HBV DETETADO < 10 UI/ml (HBV DETECTED < 10 IU/mL)



- O ADN do HBV foi detetado abaixo do intervalo quantitativo do ensaio
- IQS-H: APROVADO (PASS)
  - O IQS-H tem um Ct dentro do intervalo válido
- IQS-L: APROVADO (PASS)
  - O IQS-L tem um Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

# HBV NÃO DETETADO (HBV NOT DETECTED)



- O ADN do HBV NÃO foi detetado
- IQS-H: APROVADO (PASS)
  - O IQS-H tem um Ct dentro do intervalo válido
- IQS-L: APROVADO (PASS)
  - O IQS-L tem um Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

# Resolução de problemas

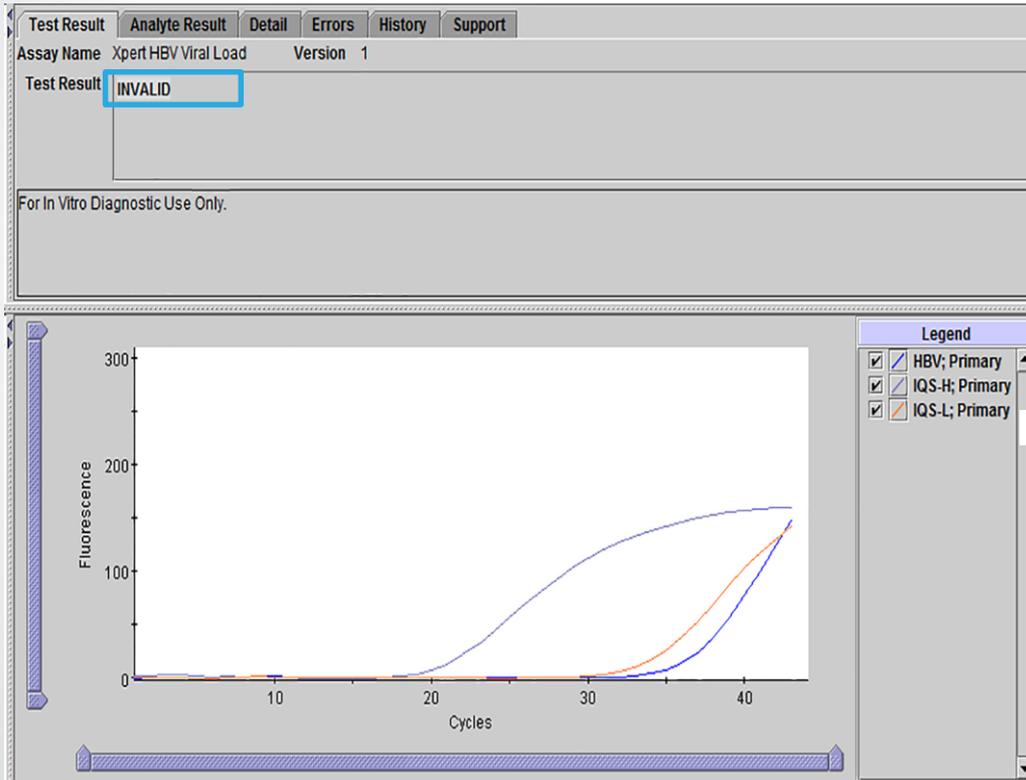


# Factores que afectam negativamente os resultados

- Colheita incorrecta da amostra
  - Não foi avaliado o desempenho com outros dispositivos de colheita e tipos de amostra
- Transporte ou conservação incorrectos da amostra colhida
  - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento correto
- Procedimento de análise incorrecto
  - Modificação de procedimentos de análise, erros técnicos ou troca de amostras podem afetar os resultados do teste
  - Para se evitarem resultados erróneos, 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 foi possível determinar a presença ou ausência de ADN de HBV.

- IQS-H e/ou IQS-L: FALHOU (FAIL)  
Os limiares de ciclo do controlo quantitativo interno não estão dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

– Causas possíveis (consultar o manual do utilizador para obter mais pormenores):

- Colheita incorreta da amostra (ou seja, 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
- Enchimento insuficiente do tubo ou bolha no tubo de PCR

– Solução

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

# Interferências no ensaio

- Substâncias potencialmente interferentes (Consultar folheto informativo para mais informações)
  - 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 HBV

Substância	Concentração testada
Albumina	9 g/dl
Bilirrubina	20 mg/dl
Hemoglobina	500 mg/dl
ADN humano	0,4 mg/dl
Triglicéridos	3000 mg/dl

- Os componentes do fármaco abaixo demonstraram **não interferir com a quantificação** ou a especificidade do ensaio Xpert HBV Viral Load

Grupo	Fármacos
1	Zidovudina, saquinavir, claritromicina, interferão alfa-2b, ritonavir, ombitasvir, paritaprevir, dasabuvir, didanosina
2	Sulfato de abacavir, fosamprenavir, peginterferão alfa-2a, ribavirina, entecavir, adefovir dipivoxil
3	Tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina, sulfato de indinavir, ganciclovir, valganciclovir HCl, aciclovir, paroxetina, telbivudina
4	Estavudina, efavirenz, lopinavir, enfuvirtida, ciprofloxacina, fluoxetina
5	Nevirapina, nelfinavir, azitromicina, valaciclovir, sertralina, tenofovir alafenamida

# Resultado ERRO (ERROR)

ERROR

Test Result	Analyte Result	Detail	Errors	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) não cumpriu 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 4 horas 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 4 horas após a adição da amostra</li></ul>

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

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, Bangladesh, Butão, Nepal e Sri Lanka	+91 1800 4209 099	<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>
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>
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>
Bélgica, Países Baixos e Luxemburgo	+33 563 825 319	<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>
Outros países não indicados nesta lista	+ 1 408 400 8495	<a href="mailto:techsupport@cepheid.com">techsupport@cepheid.com</a>

Obrigado.



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

