

Formação técnica sobre o ensaio Xpert[®] HCV Viral Load

Apenas para utilização com CE-IVD

Centro de formação da Cepheid



Agenda da formação

- **Xpert® HCV 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 e os kits de colheita de amostras do Xpert® HCV Viral Load
 - Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório
 - Colher e transportar as amostras apropriadas
 - Preparar um cartucho e executar o ensaio
 - Comunicar os vários resultados gerados pelo software
 - Compreender a estratégia de controlo do ensaio

A solução Cepheid



- Deteta e quantifica o alvo
 - ARN do VHC
 - Resultados dentro do intervalo linear de 10 UI/ml a 100.000.000 UI/ml
- Controlos internos integrados para cada amostra
 - Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)
 - Controlo de verificação da sonda (PCC — Probe Check Control)
 - Padrões de quantificação internos IQS-H e IQS-L
- Resultados em aproximadamente
 - 105 minutos
- O sistema de cartucho fechado minimiza o risco de contaminação
- Resultados a pedido 24/7
- Acesso aleatório

Utilização prevista

- O ensaio **Xpert® HCV VL**, realizado nos sistemas do instrumento **GeneXpert®**, destina-se à **quantificação rápida do ARN do vírus da hepatite C (VHC) em soro ou plasma (com EDTA — Ethylenediaminetetraacetic Acid [Ácido Etilenodiaminotetracético]) humano de indivíduos infectados pelo VHC**. O teste utiliza **transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase (RT-PCR — Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) automatizada, utilizando fluorescência para detetar o ARN relevante para a quantificação do VHC**.
- O ensaio **Xpert HCV VL** quantifica os genótipos 1–6 de VHC no intervalo de **10 UI/ml a 100.000.000 UI/ml**.
- O ensaio **Xpert HCV VL** destina-se a ser utilizado como auxiliar no **controlo de pacientes infetados pelo VHC submetidos a terapêutica antiviral**.
- O teste mede os níveis de ARN de VHC na baseline e durante o tratamento e pode ser utilizado para **prever respostas virológicas sustentadas e não sustentadas à terapêutica para o VHC**.

Utilização prevista - Observações

- Os resultados do ensaio Xpert HCV VL também podem ser utilizados para **confirmar a infecção por VHC em indivíduos positivos para anti-VHC**. Em indivíduos positivos para anticorpos anti-VHC com resultados do teste negativos para ARN de VHC, pode-se considerar a possibilidade de utilizar outro ensaio de anticorpos anti-VHC para distinção entre a exposição real ao VHC e a positividade biológica falsa.
- **A repetição do teste ARN de VHC** pode ser indicada em casos que tiveram exposição ao VHC nos últimos 6 meses ou que apresentam evidências clínicas de doença VHC.
- O ensaio **não** se destina a testes de rastreio de VHC de doadores.

Alvos e sondas

Alvos

- Padrões quantitativos internos (IQS-H) e (IQS-L)
- Região mais preservada do genoma de ARN do VHC

Sondas

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



Requisitos do Xpert® HCV Viral Load

Sistemas GeneXpert

- Software GeneXpert Dx **V4.7b** ou superior
- Software Xpertise **V6.4b** ou superior

Kits de teste (CE-IVD)

- GXHCV-VL-CE-10

Colheita de amostras

- Sangue total colhido em K2-EDTA, EDTA-PPT ou tubos de colheita de soro

Outros materiais

- Equipamento de proteção individual (EPI)
- Lixívia 1:10
- Etanol ou etanol desnaturado a 70%
- Agitador de vórtice
- Centrifugador para preparação do plasma

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® HCV Viral Load

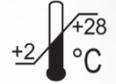
Número de catálogo	GXHCV-VL-CE-10
Cartuchos por kit	10
CD do kit	Ficheiro de definição do ensaio (ADF — Assay Definition File)
	Instruções de importação do ensaio
	Folheto informativo (PDF)
Pipetas de transferência	10 (1 ml)
Conservação	2 °C a 28 °C



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

Conservação e manuseamento do kit do Xpert® HCV Viral Load

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio HCV VL entre 2 °C e 28 °C
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas
- Não utilize tubos de colheita de reagente não validados pela Cepheid
- Abra a tampa do cartucho de teste apenas para adicionar a amostra, feche a tampa e prossiga com o processamento



Advertências e precauções

- Não agite o cartucho
- Não utilize um cartucho que...:
 - pareça húmido, com fugas ou se o selo da tampa parecer estar partido
 - pareça danificado
 - tenha caído depois de o ter retirado da embalagem
 - tenha caído ou sido agitado depois de lhe ter adicionado a amostra
 - tenha um tubo de reação danificado
 - tenha sido utilizado: cada cartucho é de utilização única para processamento de um teste
 - tenha ultrapassado o prazo de validade
- Não reutilize pipetas descartáveis usadas



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 Xpert® HCV Viral Load

- O ensaio não se destina a **testes de rastreio de doadores**
- O desempenho do Xpert HCV VL não foi demonstrado com outras amostras além daquelas validadas, ou seja, **plasma, soro**
- O desempenho do teste Xpert HCV VL 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
- 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 com o Xpert® HCV Viral Load

- **Sangue total**

- Colha as amostras de sangue total em tubos com EDTA, EDTA-PPT ou soro de acordo com as instruções do fabricante

Tubo com EDTA



Tubo de soro

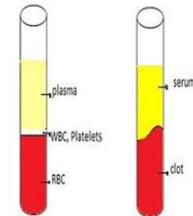


Tubo com heparina



- **Plasma/soro**

- Centrifugue para separar o plasma/soro dos glóbulos vermelhos de acordo com as instruções do fabricante
- Prepare no mínimo 1,2 ml de plasma/soro



Colheita, transporte e conservação de amostras

	Antes da realização de testes	Temperatura (°C)	Tempo de conservação
	Sangue total com anticoagulante EDTA	+15 / +35 °C	24 horas
		+2 / +8 °C	72 horas

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

	Antes da realização de testes	Temperatura (°C)	Tempo de conservação
	Plasma e soro	+15 / +35 °C	24 horas
		+2 / +8 °C	3 dias
		-70 / -18 °C	6 semanas

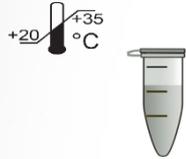
Preparação do cartucho



Preparação do cartucho do Xpert[®] HCV VL

Amostra: plasma/soro

1



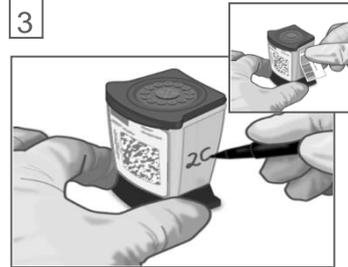
Se utilizar amostras congeladas ou refrigeradas, coloque-as à temperatura ambiente até descongelarem completamente e estejam à temperatura ambiente

2



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

3



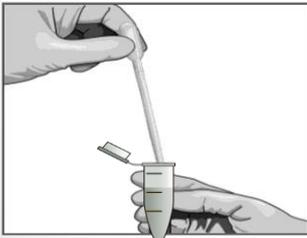
Identifique o lado do cartucho com a ID de amostra

4



Abra a tampa do cartucho

5



Pipete, pelo menos, 1 ml da amostra utilizando a pipeta fornecida*

6



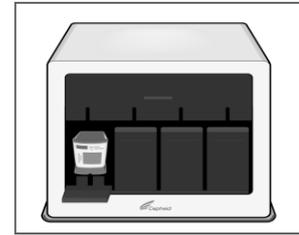
Esvazie lentamente a pipeta para a câmara da amostra do cartucho

7

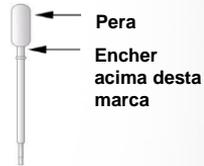


Feche a tampa com firmeza. Inicie o teste dentro do prazo indicado no folheto informativo.

8



Inicie o teste no seu instrumento GeneXpert



*Pipeta de transferência do ensaio HCV VL

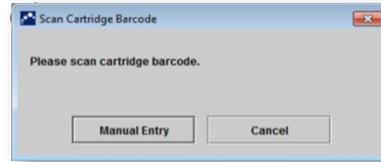
Executar um teste

1 Criar um teste

GeneXpert



2 Ler mensagens do código de barras: ID do cartucho/paciente

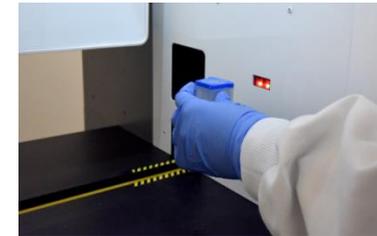
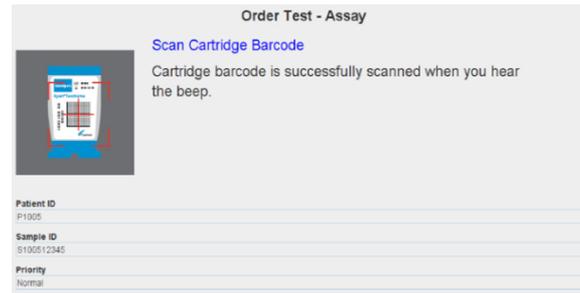


Por predefinição, não clique em **Entrada manual (Manual Entry)** nem em **Cancelar (Cancel)**

3 Ler o cartucho



GeneXpert
Infinity



"Para detalhes completos sobre como executar um teste, consultar o folheto informativo e os manuais do utilizador do GeneXpert Dx ou do Xpertise Dx.

Criar um teste no software GeneXpert Dx

4 Preencha os campos, conforme necessário

5 O protocolo do ensaio é selecionado automaticamente

6 O módulo é selecionado automaticamente
NÃO O ALTERE!!!

7 Clique em Iniciar teste (Start Test)

8 Uma luz verde vai piscar no módulo
Coloque o cartucho no módulo e feche a porta

Create Test

Patient ID
Sample ID
Patient ID 2
Last Name

Name
Select Assay: Xpert 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



Criar um teste no software Xpertise Dx

4 Preencha os campos, conforme necessário

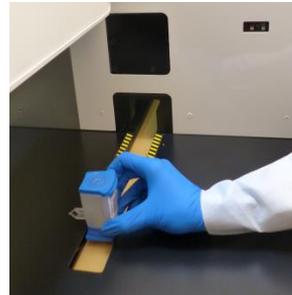
5 O protocolo do nome do ensaio é selecionado automaticamente

6 Clique em ENVIAR (SUBMIT)

7 Coloque o cartucho na correia 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 Xpert automatizado



Controlos de qualidade



- **Controlos de qualidade do Xpert HCV VL**
 - 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)
 - Controlos de verificação da sonda (PCC — Probe Check Controls)
 - Padrões quantitativos internos (IQS — Internal Quantitative Standards) alto (H — High) e baixo (L — Low) para quantificar o vírus no ARN do VHC

Controlos de qualidade internos

- **Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)**
 - Garante que o volume de amostra correto foi adicionado ao cartucho
- **Controlos de verificação da sonda (PCC — Probe Check Controls)**
 - Antes do passo de PCR, o sinal de fluorescência é medido em todas as sondas e comparado com as predefinições de fábrica para monitorizar
 - a reidratação das esferas
 - a integridade da sonda
 - o enchimento do tubo de reação
 - a estabilidade do corante
- **Padrão quantitativo interno alto e baixo (IQS-H e IQS-L)**
 - IQS baixo (10^3 cópias /ml) e IQS alto (10^6 cópias/ml)
 - 2 constructos de armored RNAs® não infecciosos
 - Assegura que a amostra foi corretamente processada
 - Detetam a inibição associada à amostra da reação RT-PCR e a presença de microrganismo
 - Os valores de Ct e de fluorescência têm de estar sempre dentro do intervalo válido

Controlos externos disponíveis no mercado

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

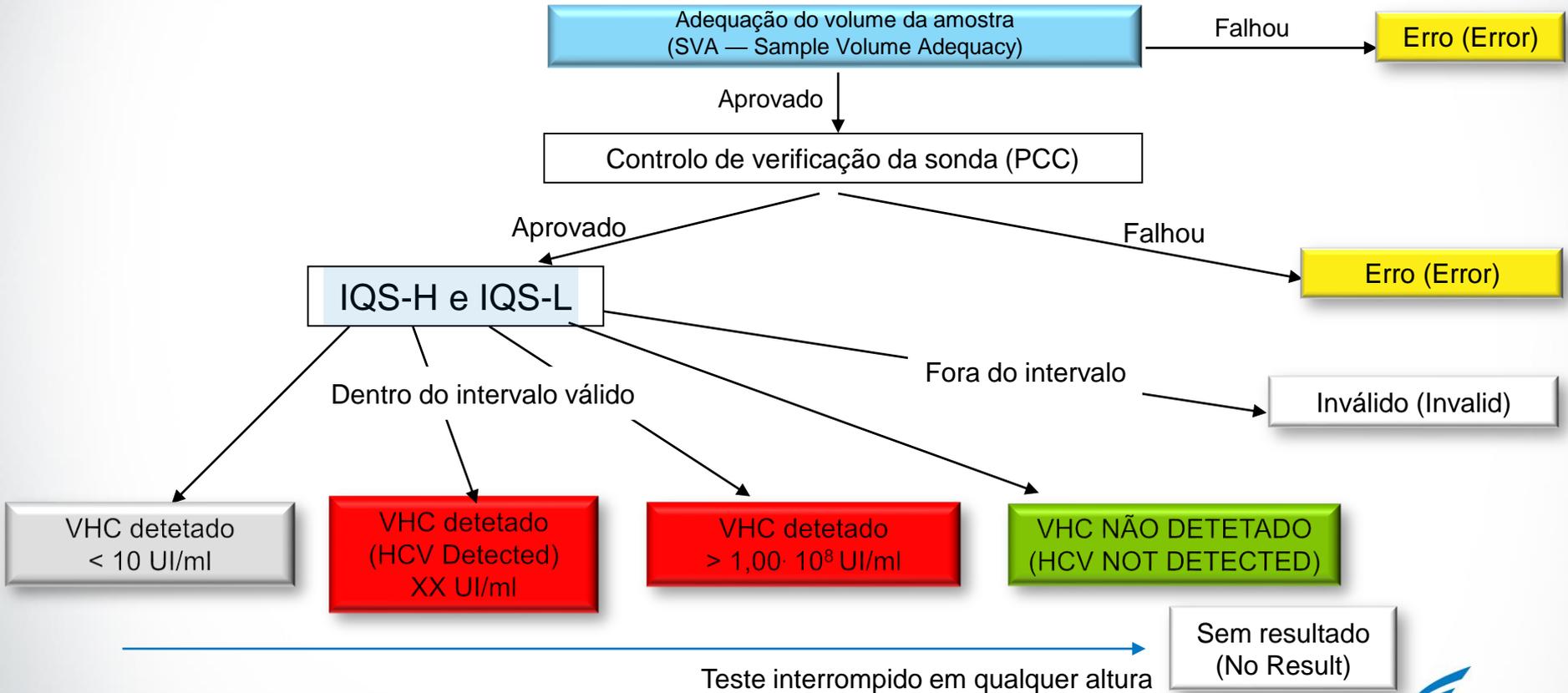
Número de referência	Descrição	Configuração	Conservação
963003	Positivo para VHC Controlo alto	1,2 ml	- 70 °C
963002	Positivo para VHC Controlo intermédio	1,2 ml	- 70 °C

- *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, estaduais, conforme aplicável.*

Interpretação dos resultados



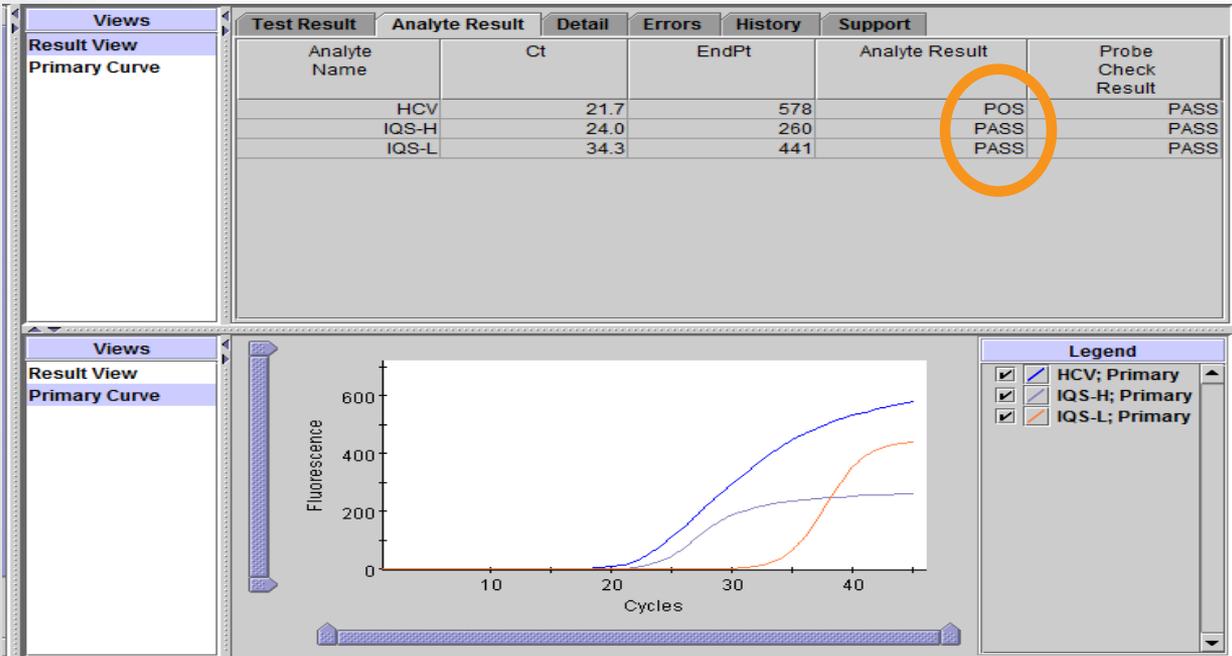
Algoritmo de interpretação dos resultados



VHC DETETADO xx UI/ml

Test Result **HCV DETECTED**

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



- O VHC-alvo é detetado num valor quantitativo
 - O ARN do VHC tem uma titulação dentro do intervalo linear do ensaio e um endpoint acima do mínimo
- 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)

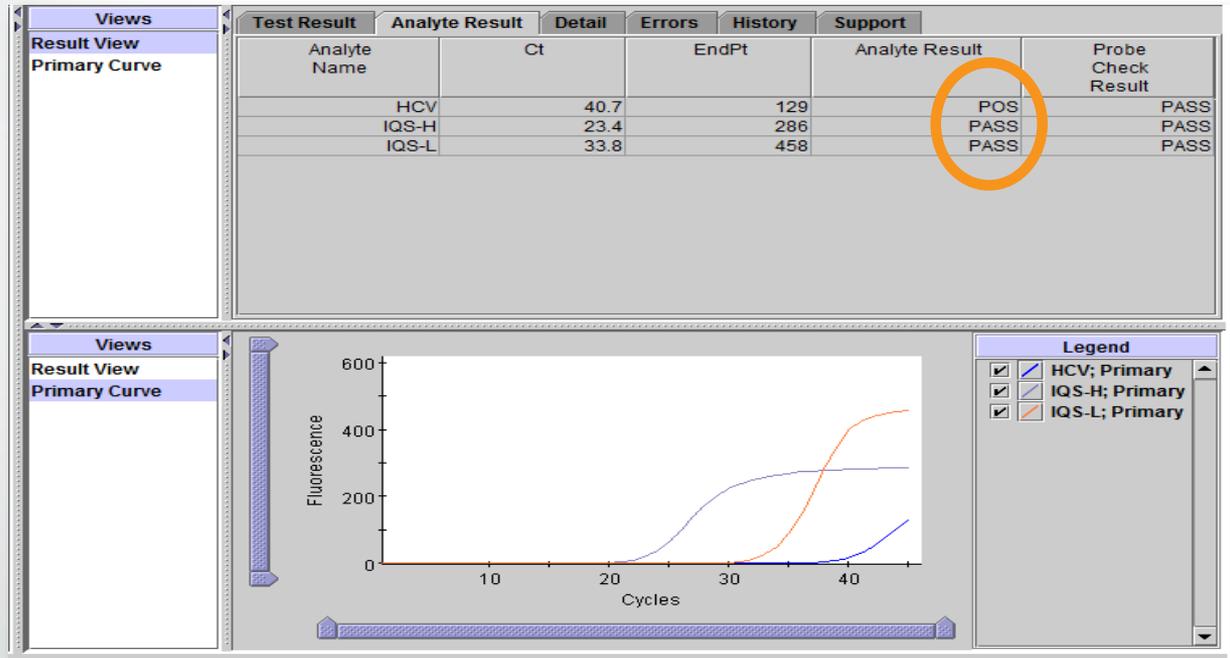
Exemplo de cálculo:

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

VHC DETETADO < 10 UI/ml

Test Result **HCV DETECTED**

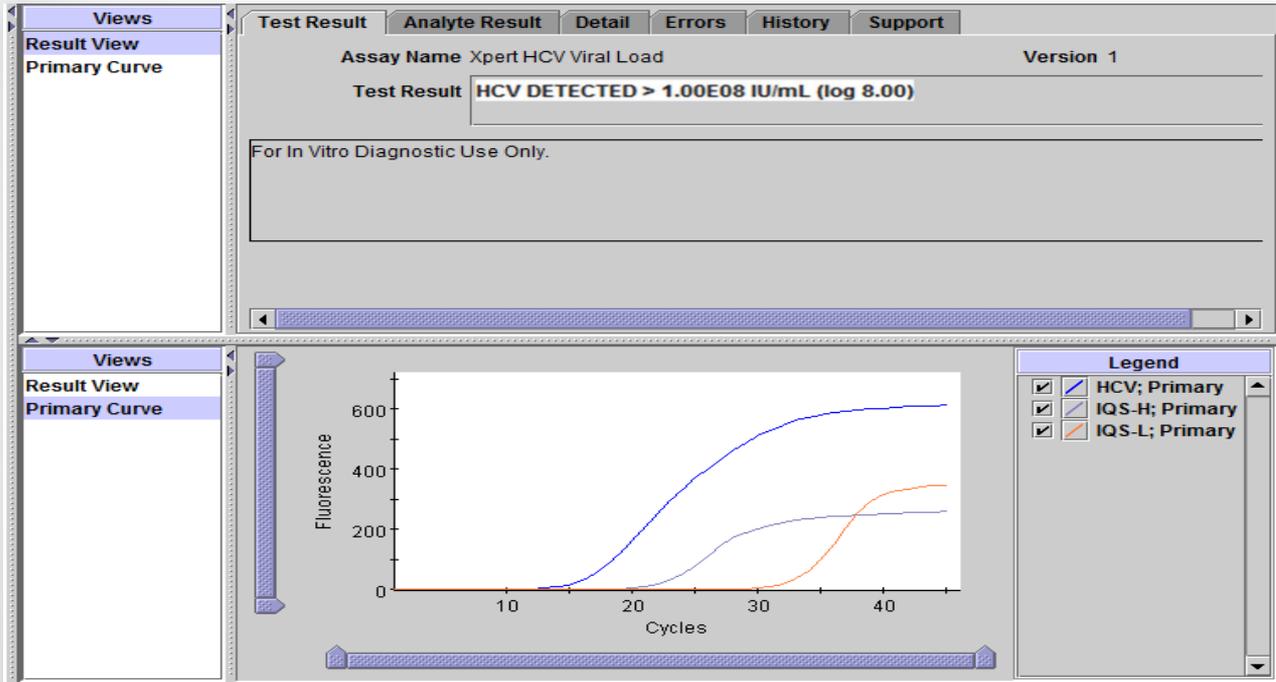
Test Result **HCV DETECTED < 10 IU/mL (log 1.00)**



- O VHC-alvo é 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)

VHC DETETADO $> 1 \times 10^8$ UI/ml

Test Result **HCV DETECTED**



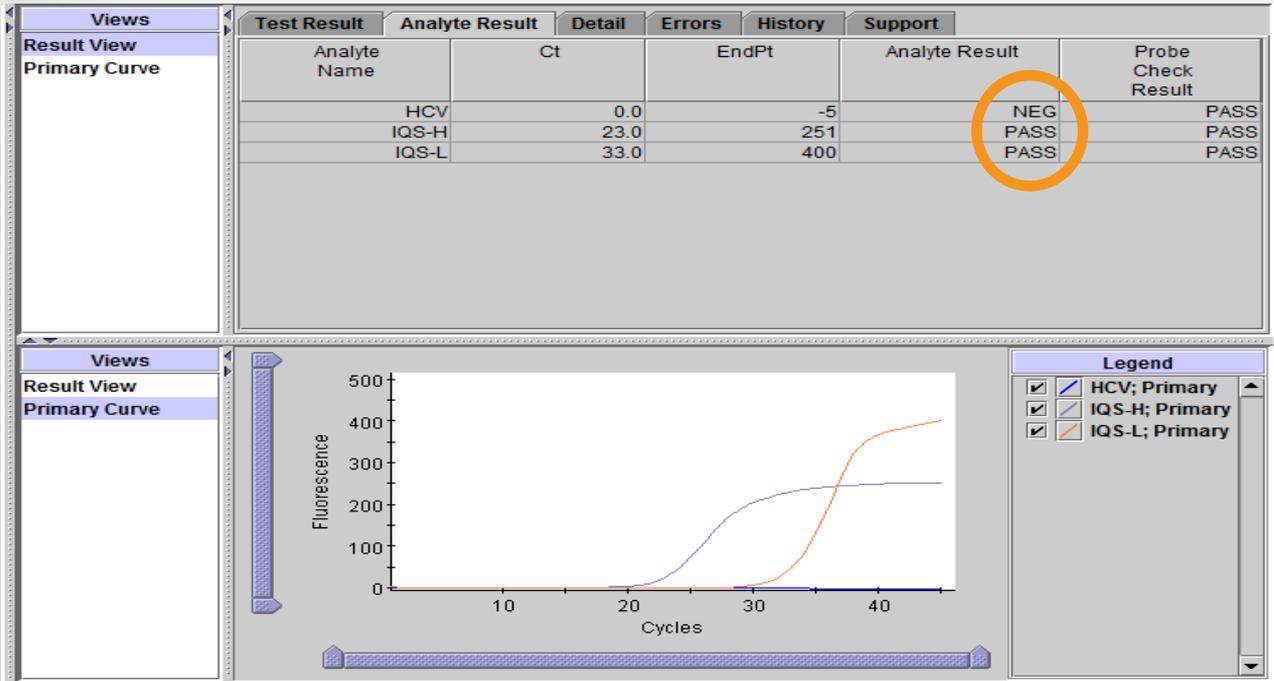
- O VHC-alvo é detetado acima do intervalo quantitativo do ensaio
- IQS-H: APROVADO (PASS)
 - O IQS-H tem um Ct dentro do intervalo válido
- IQS-L: APROVADO (PASS)
 - O IQS-L tem um Ct dentro do intervalo válido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

Exemplo de cálculo:

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

VHC NÃO DETETADO (HCV NOT DETECTED)

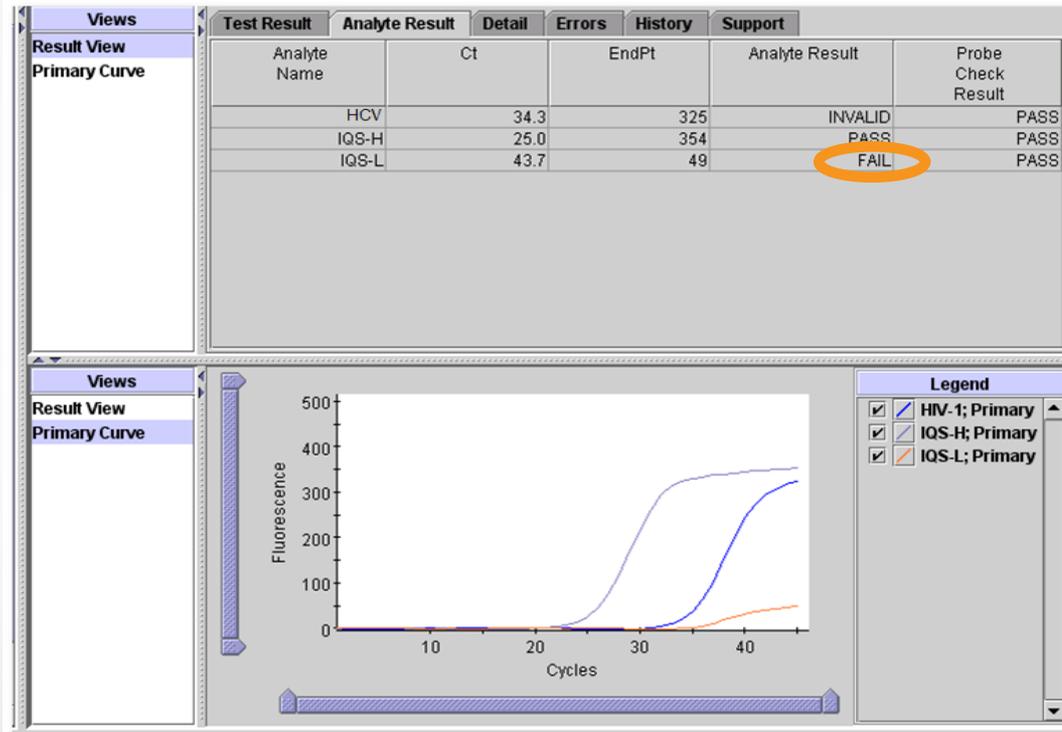
Test Result **HCV NOT DETECTED**



- O VHC-alvo não é 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)

Resultado INVÁLIDO (INVALID)

Test Result **INVALID**



- Não é possível determinar a presença ou ausência de ARN do VHC
- IQS-H e/ou IQS-L: FALHOU (FAIL)
 - Os limiares de ciclo do controle quantitativo interno não estão dentro do intervalo válido
 - O endpoint é inferior ao mínimo definido
- Verificação da sonda: APROVADO (PASS)

Relatório de tendências do paciente

- **Pode monitorizar um paciente específico durante um período de tempo, mediante criação de um relatório de tendências**

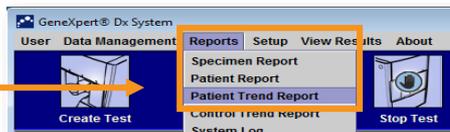
1 Seleccione Relatórios (Reports) e Relatório de tendências do paciente (Patient Trend Report)

2 Escolha

- Intervalo de tempo
- ID de paciente
- Ensaio
- Preferências do alvo

4 Pré-visualize o relatório

5 Ver o seu relatório



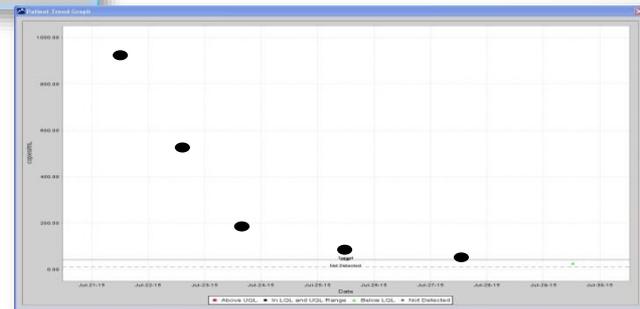
Date
 All
 Select From: MM/DD/YY To: MM/DD/YY

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

Buttons: Generate Report File, Preview PDF, Close



Resolução de problemas

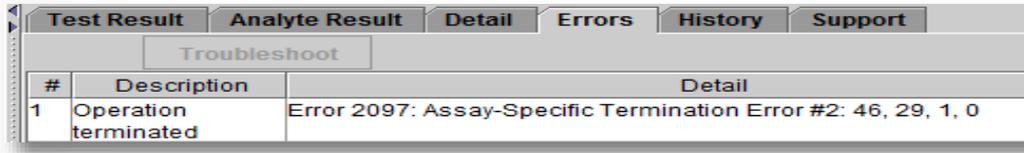


Fatores que afetam negativamente os resultados

- Colheita incorreta da amostra
 - Não foi avaliado o desempenho com outros dispositivos de colheita e tipos de amostra
- Transporte ou conservação incorretos da amostra colhida
 - As condições de transporte e conservação são específicas para cada amostra
 - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento correto
- Procedimento de análise incorreto
 - A modificação dos procedimentos de análise pode alterar o desempenho do teste
 - Para se evitarem resultados erróneos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções do folheto informativo

Erros 2096/2097

- O controlo de **Adequação do volume da amostra (SVA — Sample Volume Adequacy)** verifica se foi adicionado o volume correto de amostra ao cartucho



The screenshot shows a software interface with a 'Troubleshoot' tab selected. Below the tab, there is a table with columns for '#', 'Description', and 'Detail'. The table contains one entry: #1, Description: Operation terminated, Detail: Error 2097: Assay-Specific Termination Error #2: 46, 29, 1, 0.

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

Código de erro	Motivo	Solução
2096	Nenhuma amostra adicionada	Certifique-se de que a amostra é adicionada ao cartucho
2097	Não foi adicionada amostra suficiente	Certifique-se de que é adicionado ao cartucho um volume de amostra mínimo

SEM RESULTADO (NO RESULT)

NO RESULT

The screenshot shows a software interface for the Xpert HCV Viral Load test. 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.

- Não foi possível determinar a presença ou ausência de VHC.
- SEM RESULTADO (NO RESULT) indica que os dados colhidos foram insuficientes.
- IQS-H ou IQS-L: SEM RESULTADO (NO RESULT)
- Verificação da sonda: NA (não aplicável)
- **Causa**
 - O teste foi interrompido com o botão Parar teste (Stop test)
 - Falha elétrica
- **Solução**
 - Assegurar a alimentação
 - Repetir o teste com um cartucho novo

Interferência no Xpert® HCV Viral Load

- **Substâncias potencialmente interferentes**

- Foi avaliado um total de 5 substâncias endógenas
- Demonstrou-se que níveis elevados destas substâncias endógenas **não afetaram** a especificidade do ensaio nem interferiram na deteção do HCV VL

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 HCV VL

Grupo	Fármacos
Controlo	N/A
1	Zidovudina, saquinavir, ritonavir, interferão-alfa 2b, claritromicina
2	Sulfato de abacavir, fosamprenavir cálcico, peginterferão 2b, ribavirina
2	Tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina (3TC), sulfato de indinavir, ganciclovir, valganciclovir HCl, aciclovir
4	Estavudina (d4T), efavirenz, lopinavir, enfuvirtida (T-20), ciprofloxacina
5	Nevirapina, mesilato de nelfinavir, azitromicina, valaciclovir HCl

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

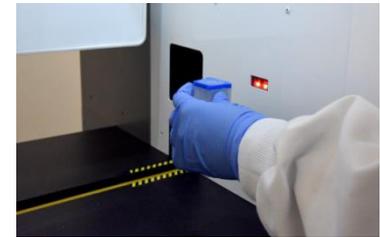
Rotule apropriadamente como repetição do teste no cartucho novo

Processe a amostra de acordo com o folheto informativo

4



Execute o teste no sistema



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



Obrigado.

www.Cepheid.com

