

1. La tecnologia GeneXpert[®]



 **Cepheid[®]**
A better way.

Componenti del Sistema GeneXpert Dx



- **Moduli GeneXpert**
 - Fluidica di precisione
 - Sistema termico e ottico
- **Cartucce**
 - Già pronte per l'uso
 - Monouso
- **Computer**
 - Desktop o Laptop
 - Xpert Software
 - Scanner per codici a barre
- **Accessori opzionali**
 - Stampante
 - UPS

Cartuccia GeneXpert®

- **Applicabilità universale**
 - Malattie infettive
 - Oncologia
 - Malattie genetiche
- **L'intero test avviene all'interno della cartuccia**
 - Preparazione del campione
 - Amplificazione
 - Identificazione
- **La stessa tecnologia alla base di tutti i test e di tutte le varie configurazioni di GeneXpert®**



Sistema GeneXpert®

Una sola piattaforma per ESTRAZIONE, AMPLIFICAZIONE E IDENTIFICAZIONE di DNA/RNA

Cartucce monouso che includono reagenti + controlli

Un'unica piattaforma per molte applicazioni

Strumento modulare, Random Access 24/7

Test rapidi / impatto immediato

Elevata processività

Real-Time PCR: sensibilità/specificità elevate & approccio multiplex

Assenza di contatto diretto tra campione e strumento

Sistema GeneXpert®

Sistema di controlli multipli per ogni test

Interpretazione automatica del risultato

Processamento in contemporanea di parametri diversi

Manutenzione dello strumento estremamente semplice

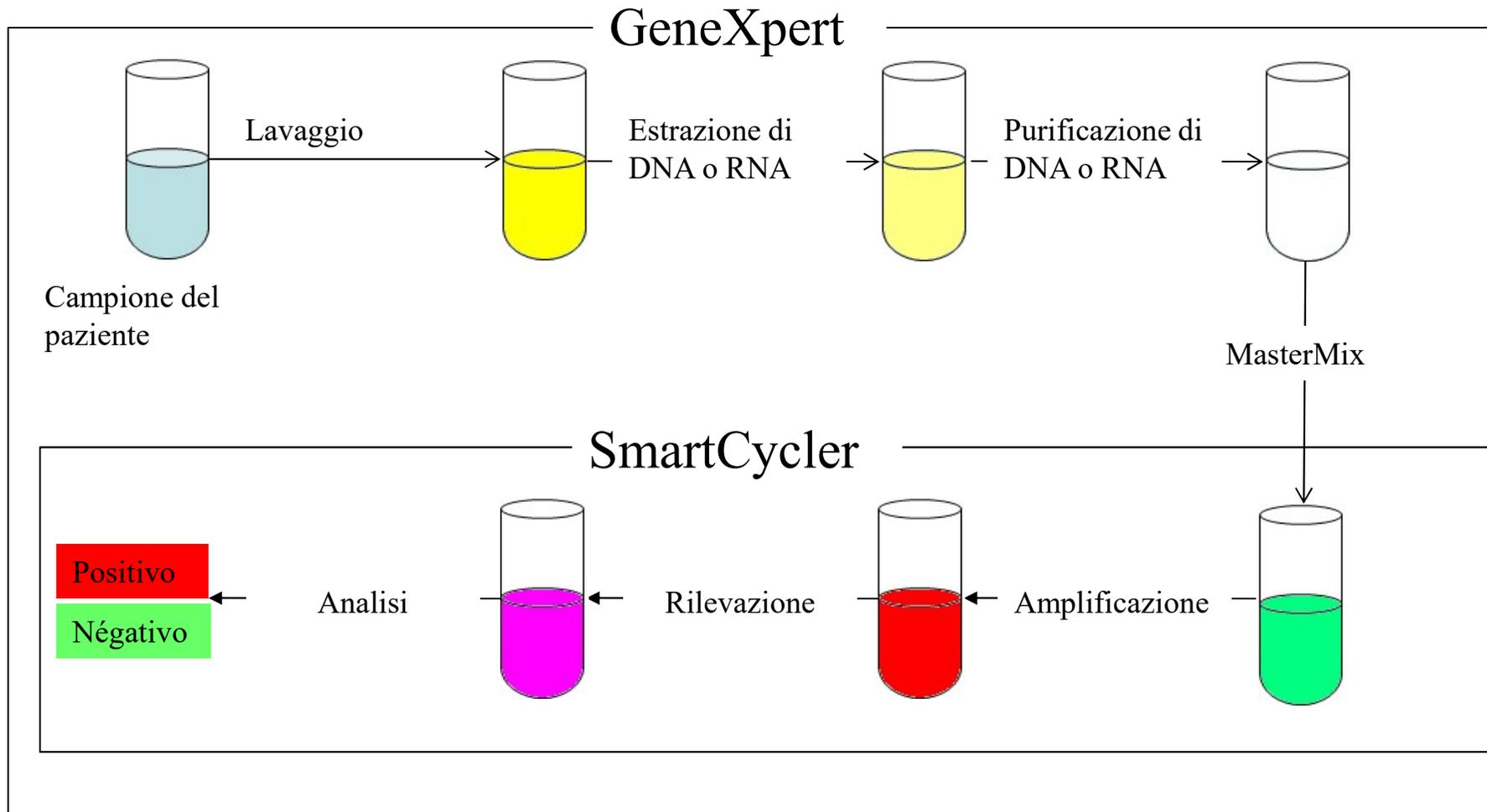
Manualità ridotta al minimo, no personale dedicato

Kit conservati a Tamb

Sistema di estrazione chimica + ultrasuoni, anche per campioni difficili

Predisposizione per collegamento bidirezionale al LIS

Tecnologia Cepheid



Cartuccia e Modulo GeneXpert

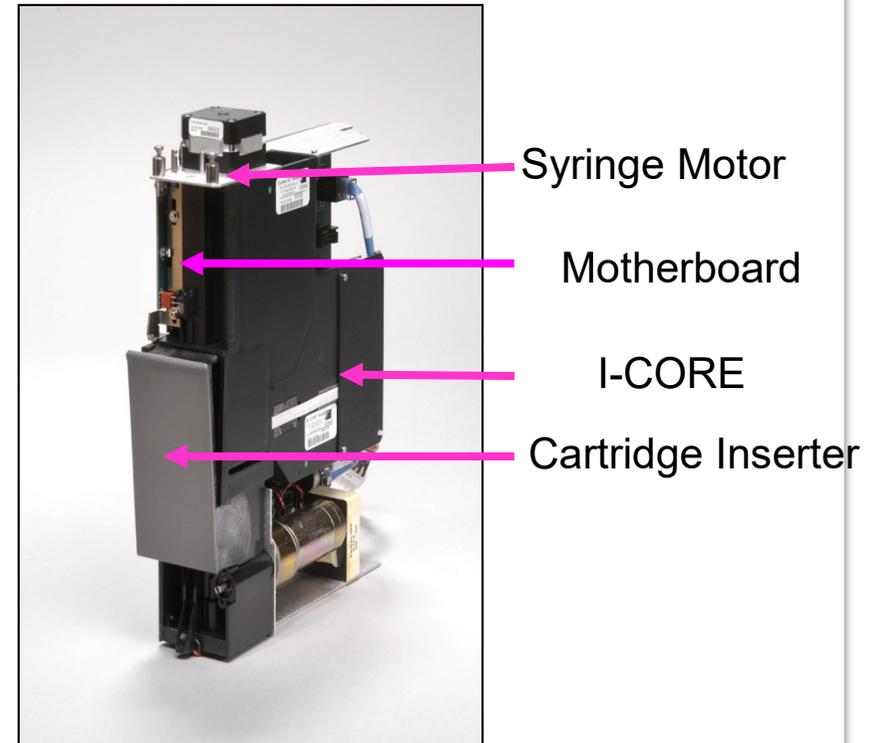
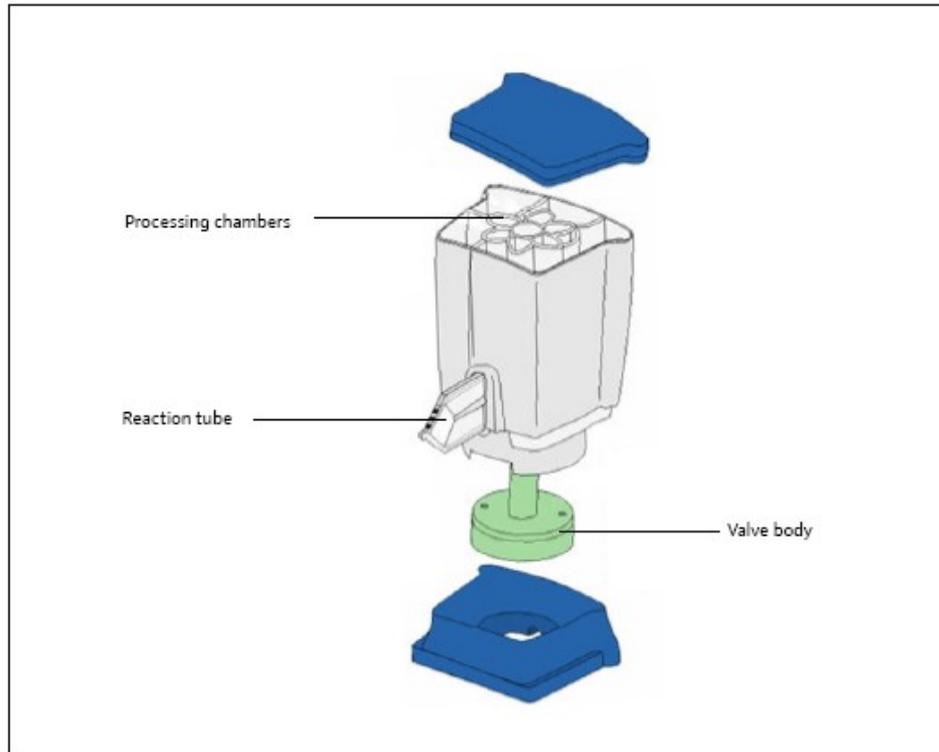
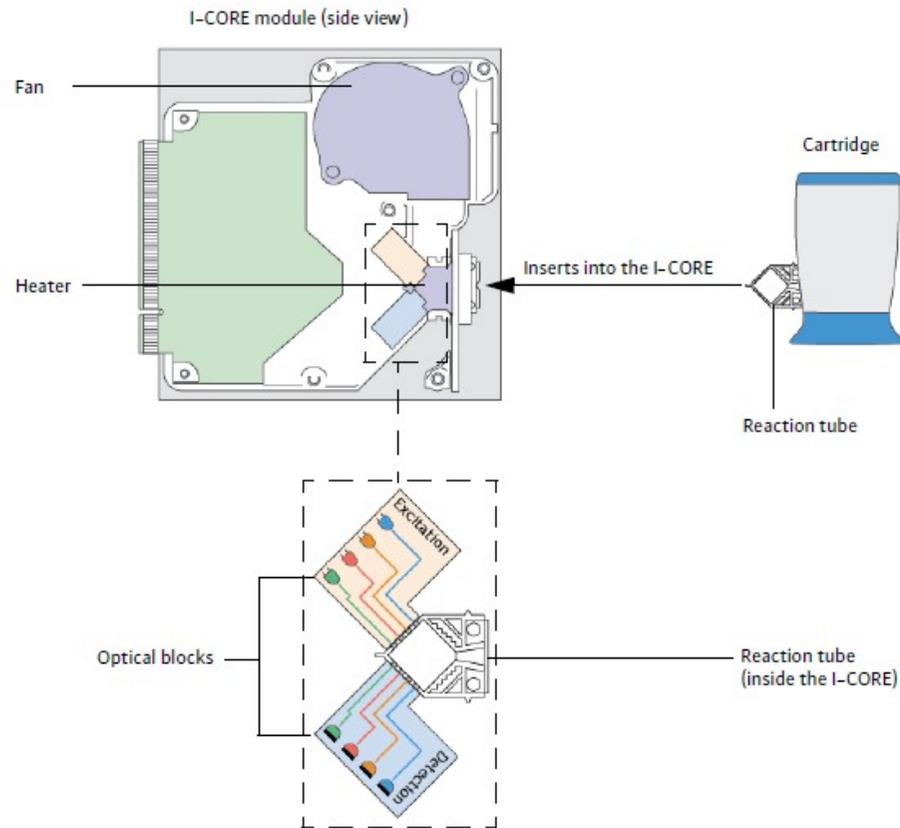


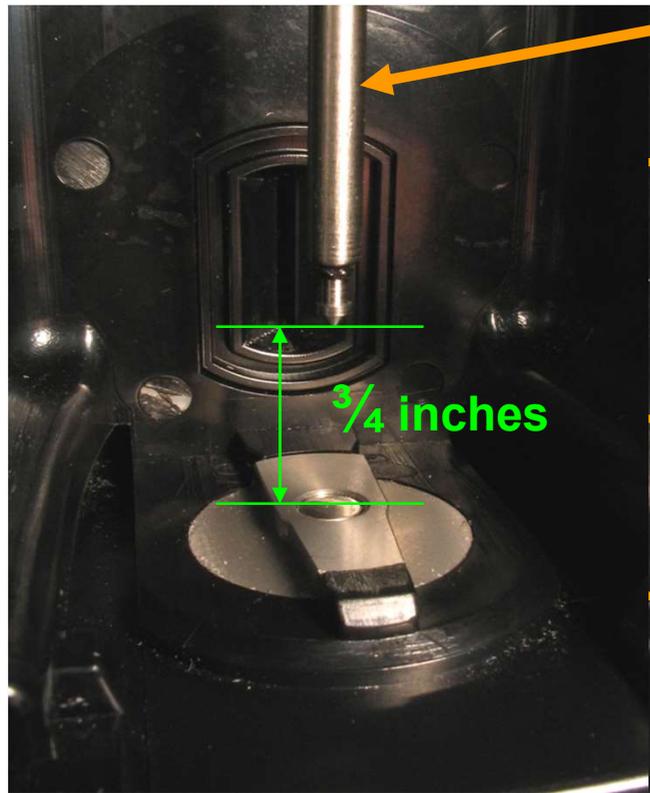
Figure 3-1. The GeneXpert cartridge components.

Modulo I-Core

Sistema ottico e termico Smart Cyclor / GeneXpert



Camera interna del modulo



Pistone

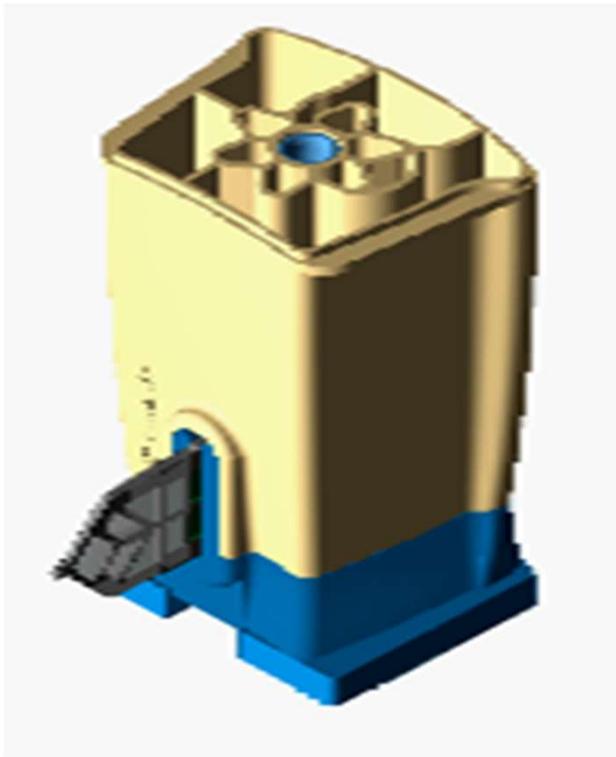
Fessura di inserzione dell' ICORE

Valvola rotatoria

Corno Ultrasonico

Tecnologia Cepheid - Cartuccia

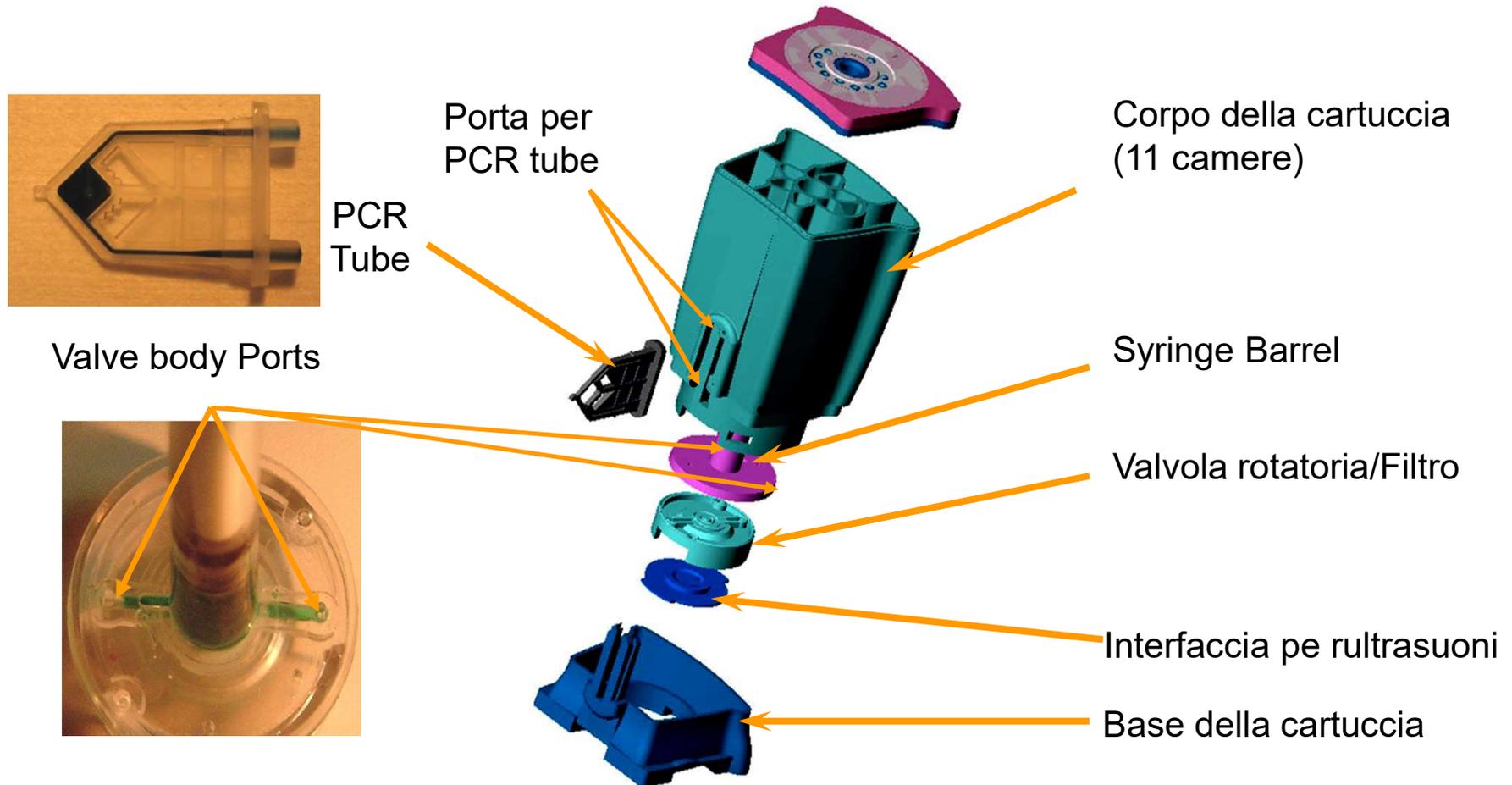
GeneXpert



SmartCycler



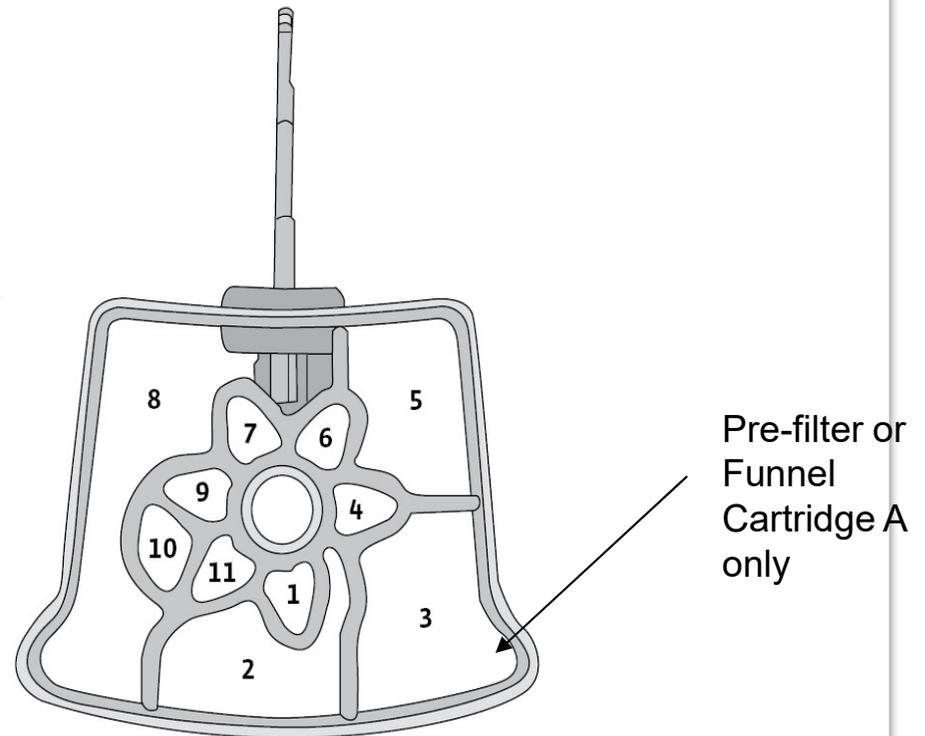
Cartuccia GeneXpert



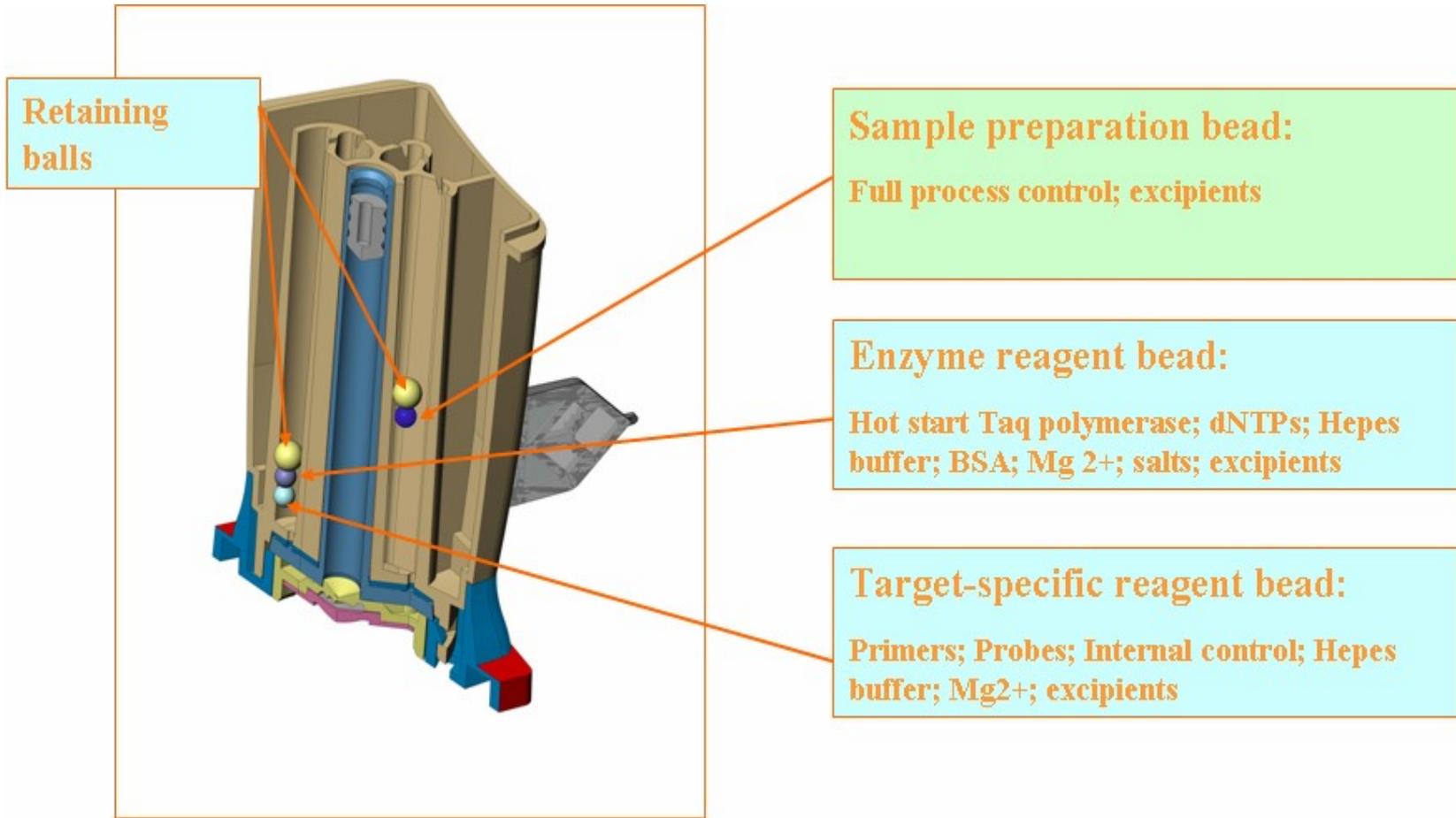
Cartuccia GeneXpert

Caratteristiche principali:

- 11 camere
- Camere esterne utilizzate per il trattamento del campione
- Camere interne contengono i reagenti
- Due tipologie di cartucce principali:
 - Cartridge A
 - Cartridge C
- Il corpo delle cartucce A e C è identico. L'unica differenza è la parte inferiore.



Cartuccia - Visione laterale



Video



Protocollo totalmente automatizzato

PIATTAFORMA E TEST TOTALMENTE INTEGRATI

Inserire e spezzare lo swab
nella Vial del Sample
reagent



1

Vortexare e versare il
contenuto della vial
all'interno del foro nella



2

Inserire la cartuccia e far
partire il test



3

Total Hands-On time <1 Minute

Laboratorio di biologia molecolare all'interno della cartuccia



2. Real-Time PCR



 **Cepheid®**
A better way.

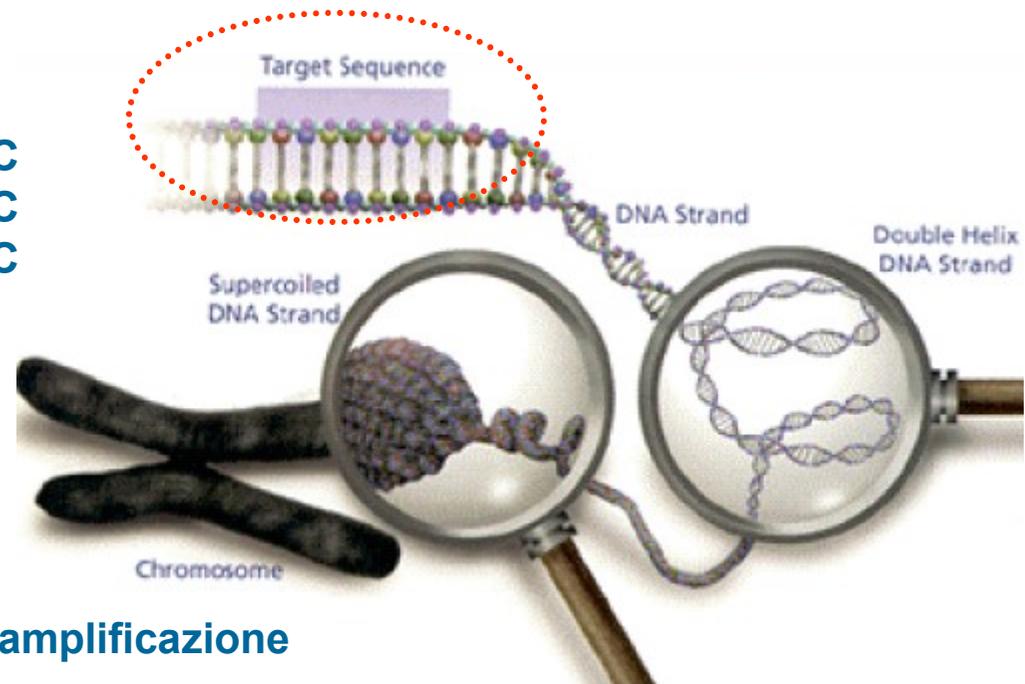
Che cos' è la PCR?

Sintesi enzimatica “*in vitro*” che permette di ottenere molte copie di uno specifico frammento di DNA (**sequenza target**).

1. Cicli termici ripetuti

- Denaturazione
- Annealing
- Estensione

95°C
55°C
72°C

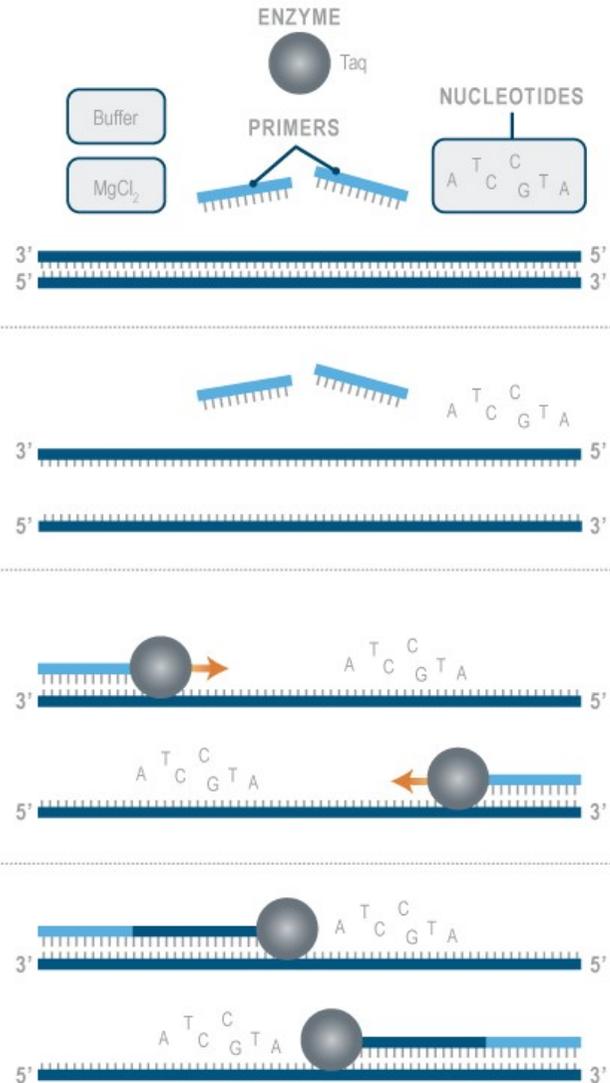


2. Oligonucleotidi (primers)
che “innescano” la reazione di amplificazione

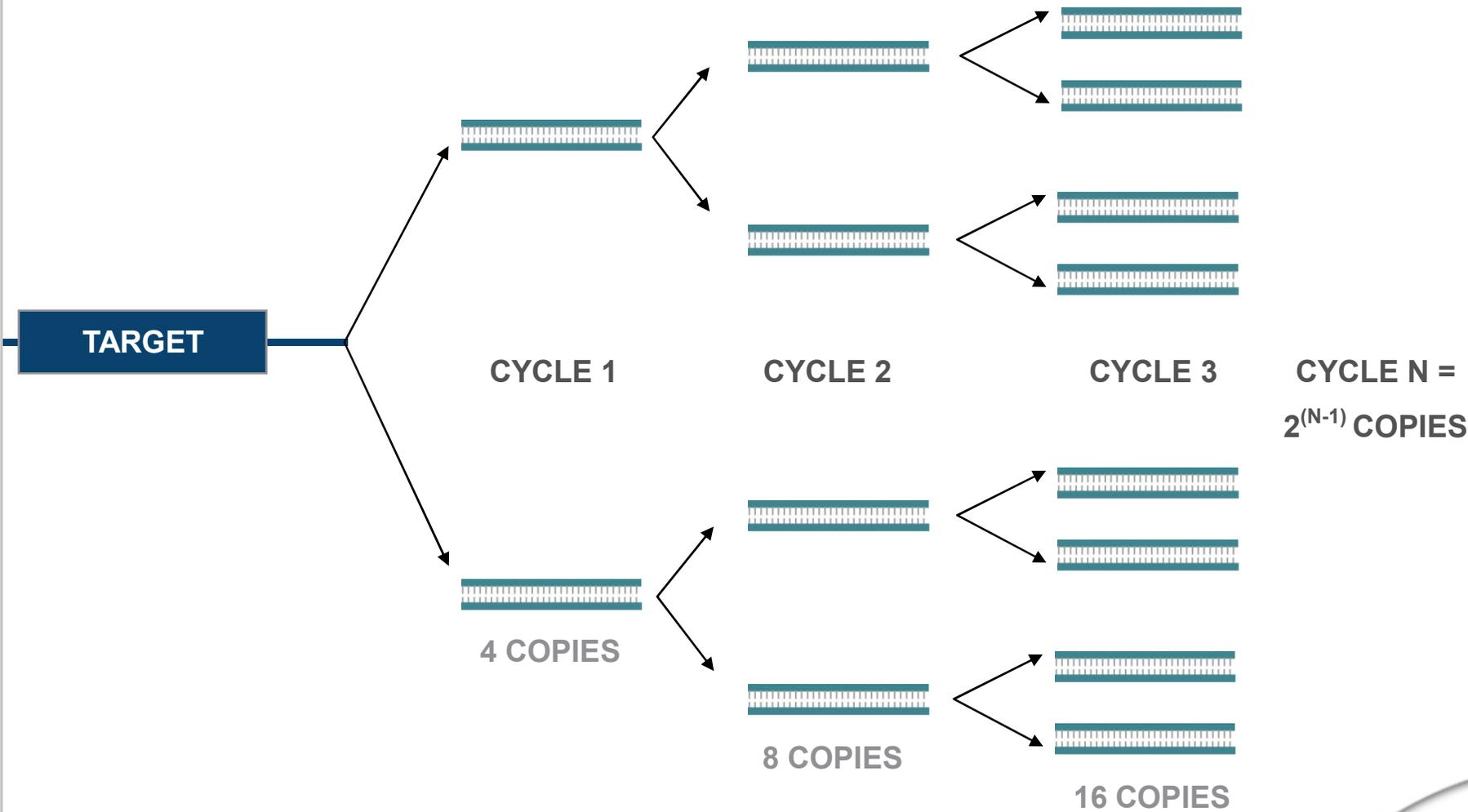
3. Enzima termostabile (Taq polimerasi)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

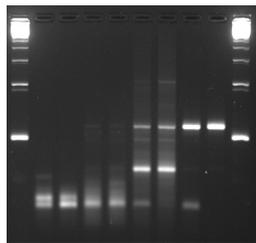
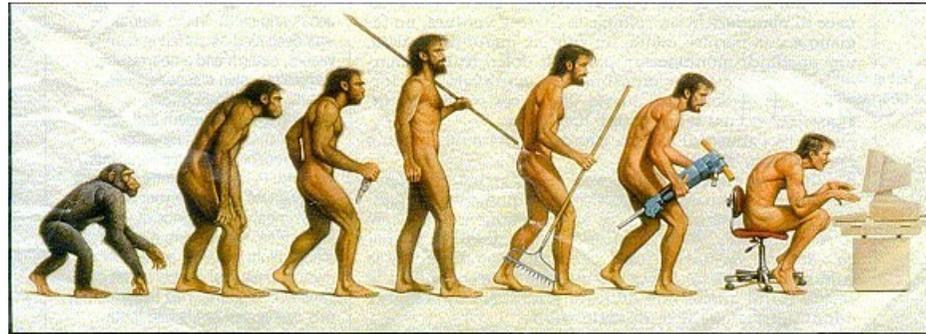
Double Stranded DNA,
free nucleotides, enzyme,
primers, MgCl₂ and buffer



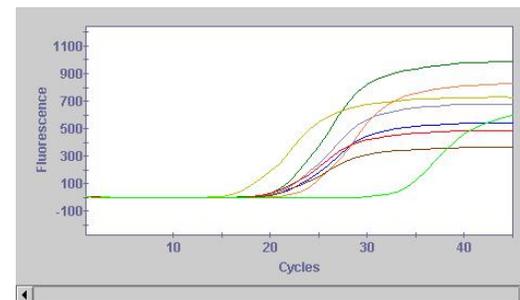
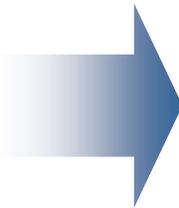
Cicli PCR



Evoluzione della PCR



Analisi End-point



Identificazione dell'amplificato durante la reazione

Che cos' è la Real-Time PCR?

Permette di monitorare l'andamento della reazione in tempo reale. E' una tecnica basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti: l'emissione di fluorescenza è direttamente correlata alla quantità di DNA amplificato.



RT-PCR: tecnologia di amplificazione potente e versatile

- **Rapidità**
- **Semplicità**
- **Elevata sensibilità**
- **Elevata specificità**
- **Multiplexing**
- **Discriminazione allelica**
- **Quantificazione DNA/RNA:**
 - ☺ **quantificazione assoluta (carica virale)**
 - ☺ **quantificazione relativa (espressione genica)**

La formula della PCR

**Correlazione tra la quantità di DNA
amplificato e la quantità di DNA target di
partenza**

$$Y = X (1 + E)^n$$

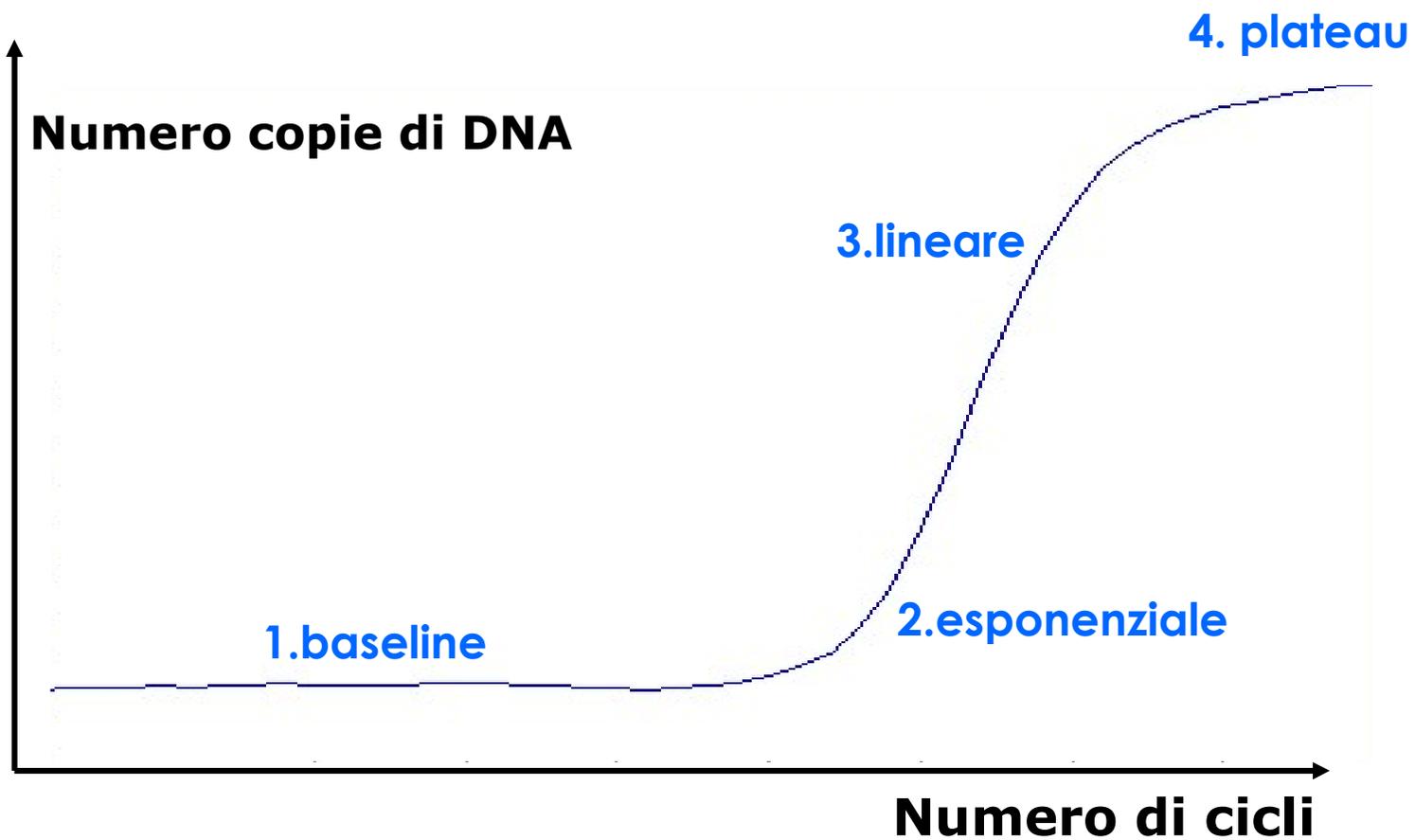
Y = quantità di DNA amplificato mediante PCR

X = quantità di DNA target di partenza

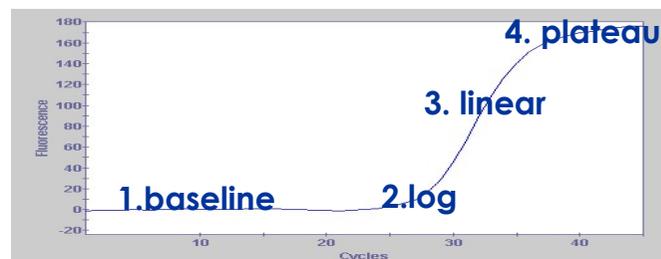
E = efficienza di amplificazione

n = numero di cicli effettuati

Curva di amplificazione



Analisi di una curva di amplificazione



Baseline: prima fase dell'amplificazione, quantità di DNA ancora bassa, fluorescenza del DNA target non supera il background.

Fase esponenziale: raddoppio della quantità di DNA ad ogni ciclo di amplificazione (100%E). La quantità di DNA amplificato è direttamente correlata alla quantità di DNA iniziale presente nel tubo di reazione.

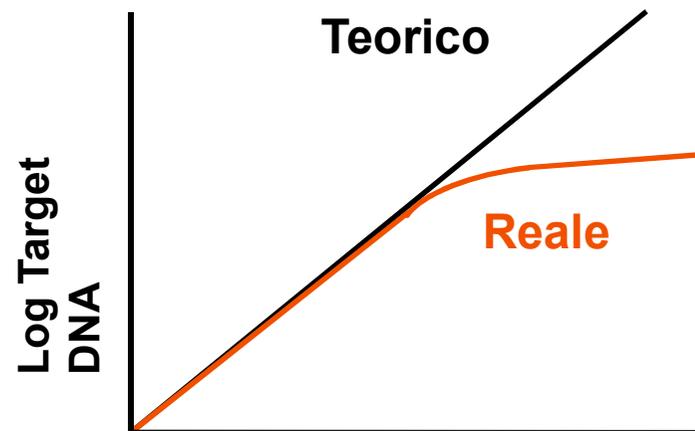
Fase lineare: la concentrazione dei primer diminuisce, la reazione diminuisce e l'enzima (Taq polimerase) perde efficienza.

Plateau (end point): non si osserva più amplificazione, e il prodotto dell'amplificazione delle fasi precedenti subisce un processo di degradazione.

Realtà vs Teoria

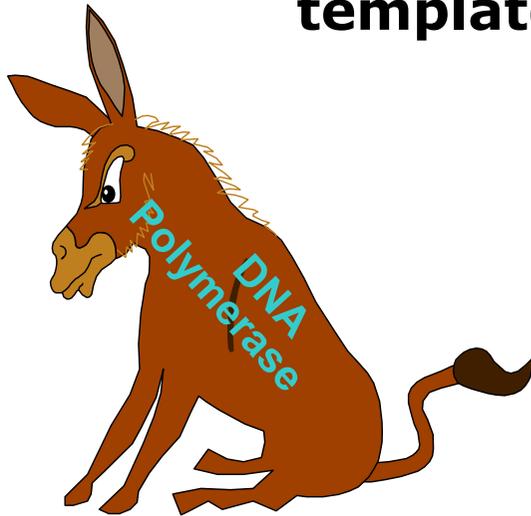
L'amplificazione è esponenziale, ma questo incremento esponenziale è limitato nel tempo:

- Un incremento lineare segue l'incremento esponenziale
- Plateau finale
- Il livello di plateau NON è correlato alla quantità iniziale di DNA target



Amplificazione PCR nella vita reale...

- ☹ **L'efficienza non è 100%**
- ☹ **L'enzima perde efficienza**
- ☹ **I primers perdono la competizione con il
templato**



Fase esponenziale

Durante la fase esponenziale:

Non ci sono fattori limitanti

Il prodotto di PCR si accumula in maniera costante

I replicati sono riproducibili

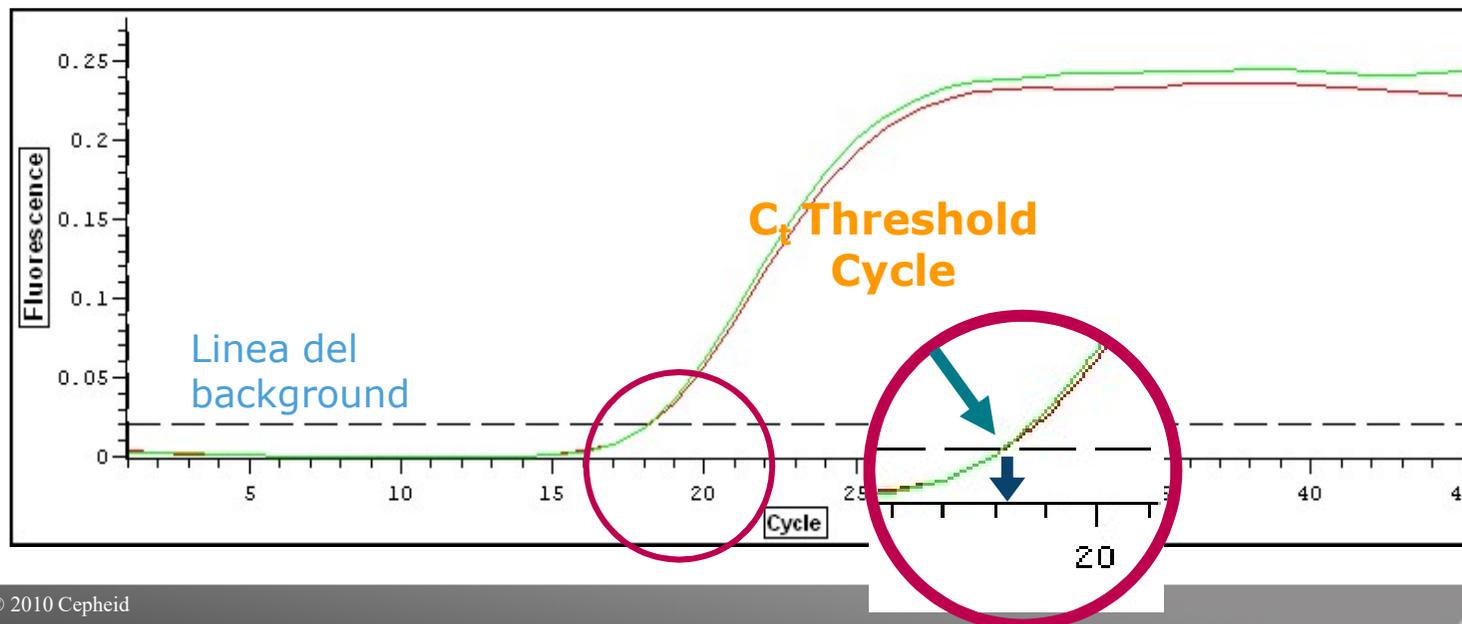
Quindi:

Il momento migliore per la quantificazione è all'inizio della fase esponenziale

Il concetto di C_t - Threshold Cycle

C_T THRESHOLD CYCLE (CICLO SOGLIA)

Il ciclo soglia (C_T) è il punto della reazione di amplificazione in cui la fluorescenza supera in maniera significativa il segnale di background.



Relazione tra C_T e quantità di DNA target

Cycles
amount

DNA

1

2

2

4

3

8

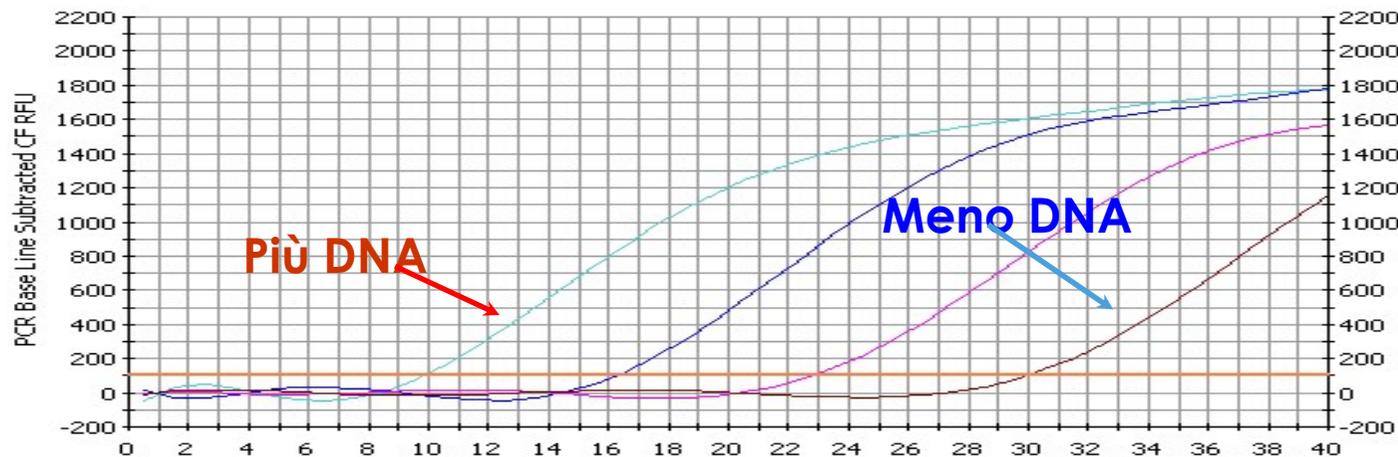
4

?

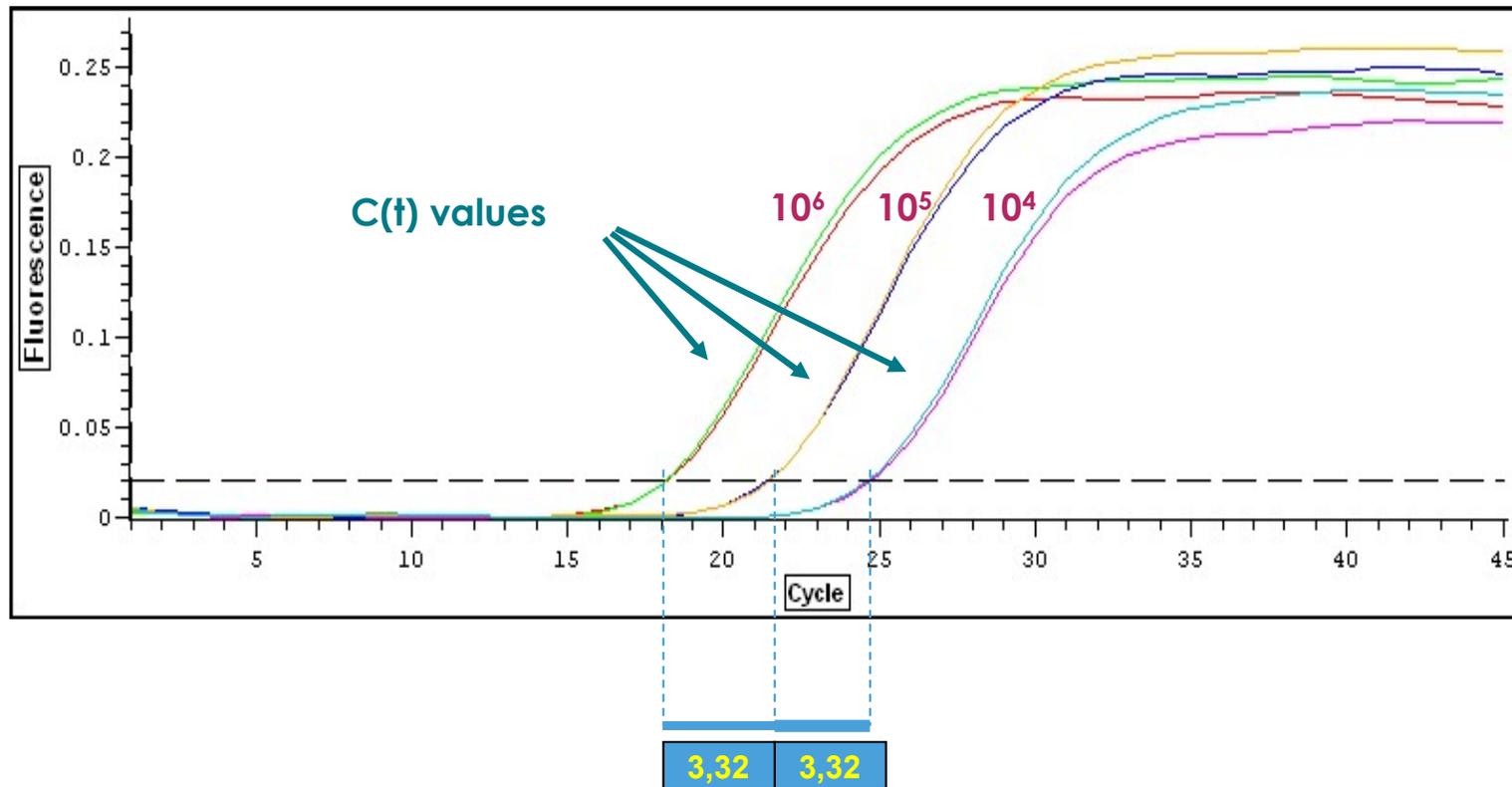
**3,32 cicli per ottenere una quantità di DNA
10 volte maggiore
1 log di differenza**

Come possiamo utilizzare il ciclo soglia?

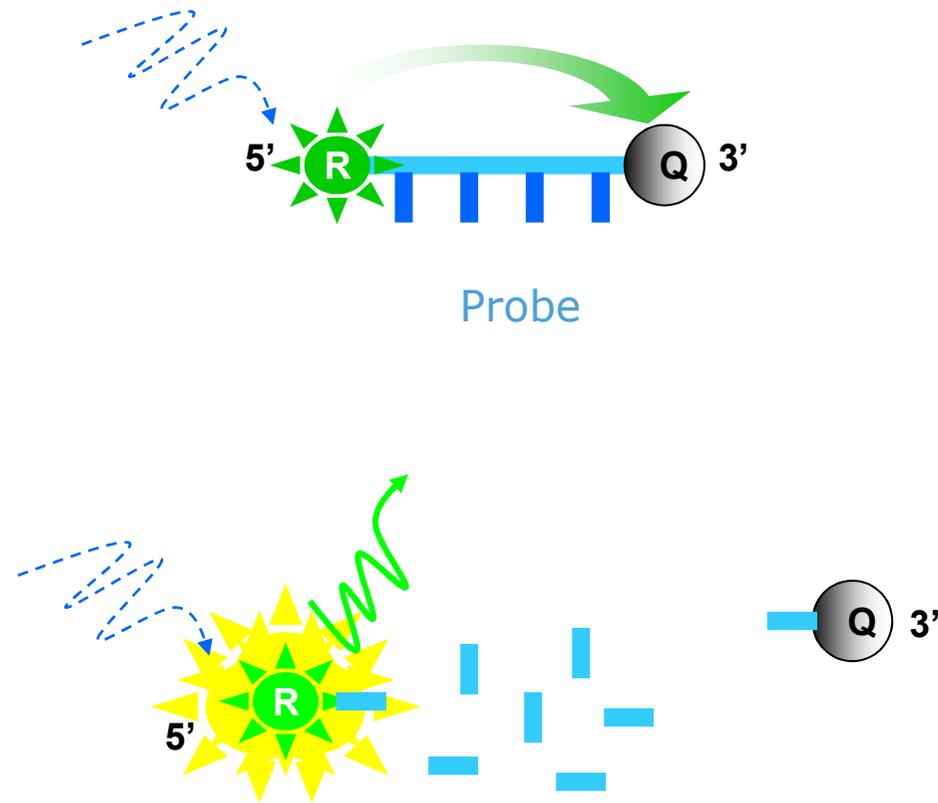
- C_t è correlato alla quantità iniziale del DNA target
Se la quantità di template è doppia, il C_t arriva un ciclo prima
Se la quantità di template è la metà, il C_t arriva un ciclo dopo
- C'è una relazione lineare tra il log della quantità iniziale di DNA e il relativo threshold cycle durante la real-time PCR



Correlazione tra C_T e quantità di DNA target di partenza



Chimiche fluorogeniche: Taqman™ probes

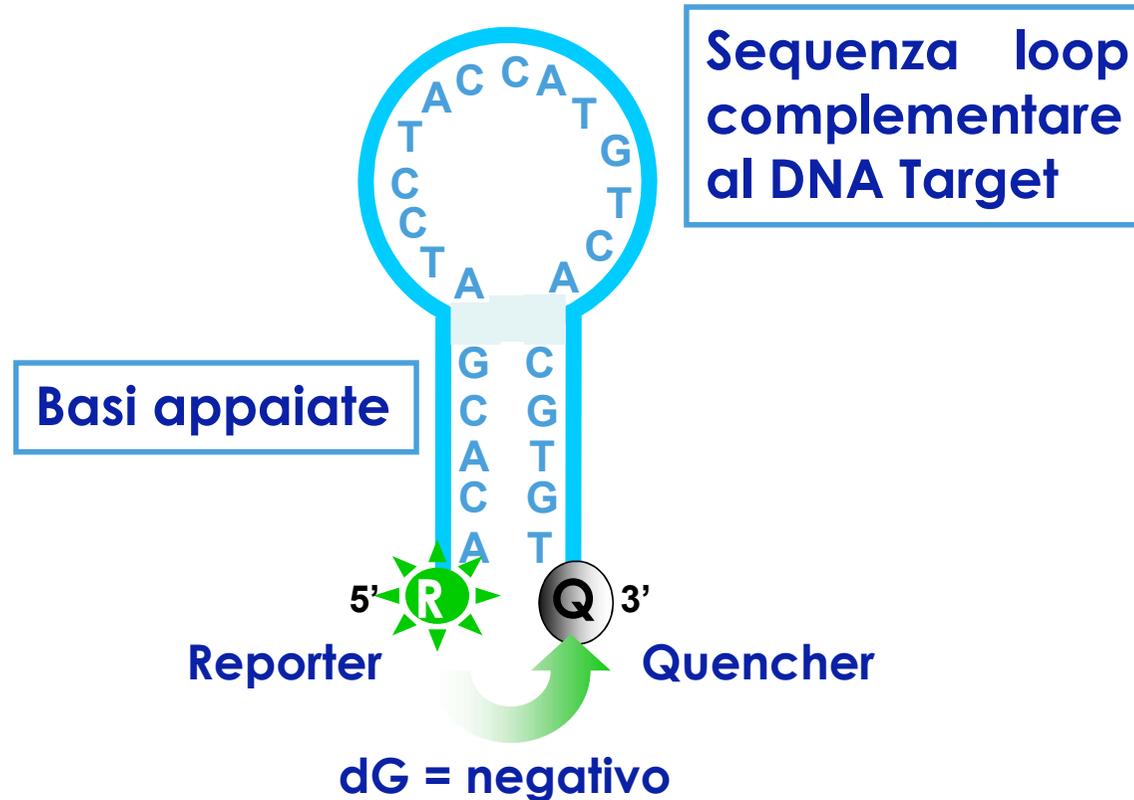


Probe frammentata per azione dell'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi

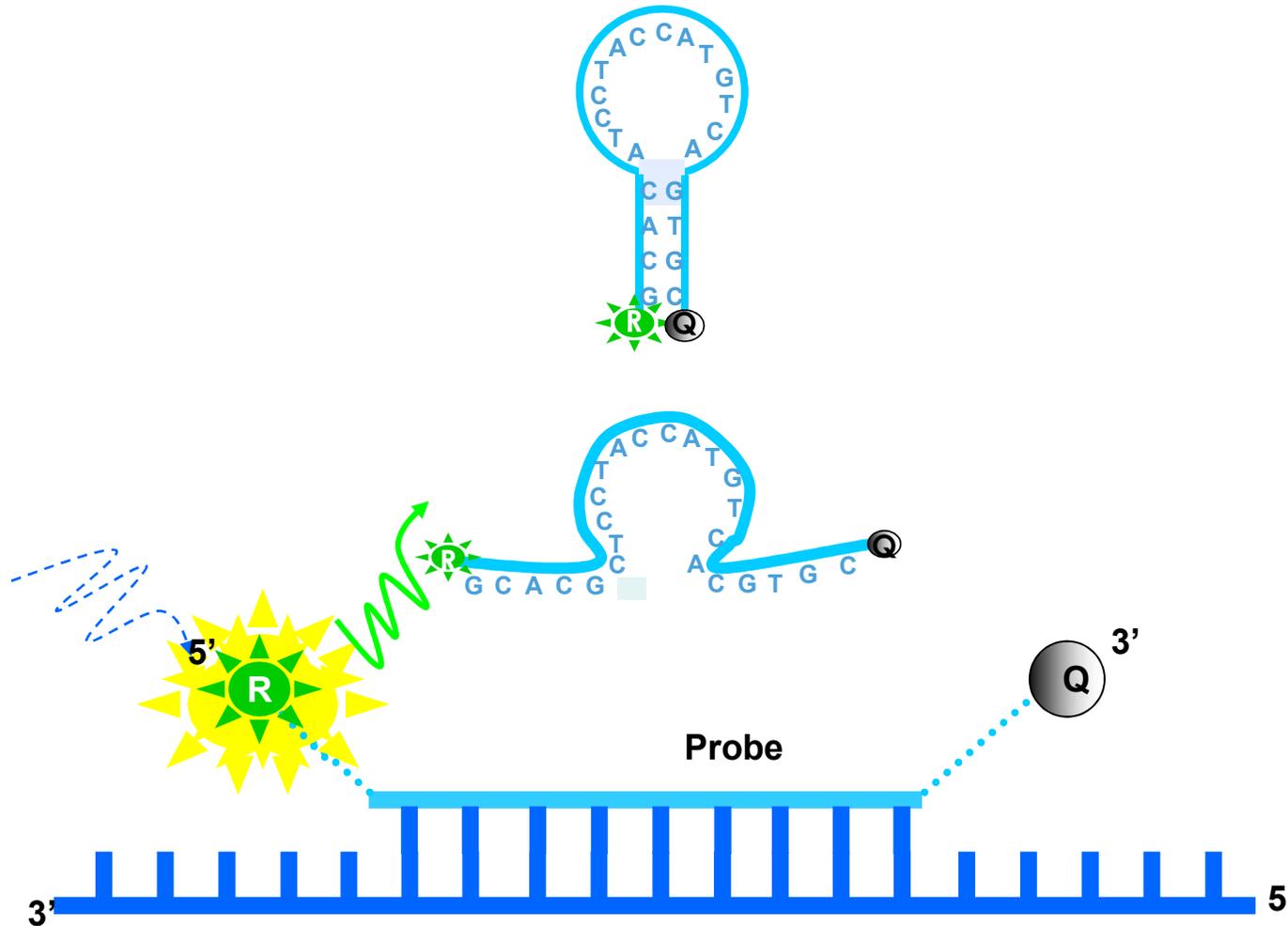
Chimiche fluorogeniche: Molecular Beacons

Sviluppata dal **Dr. Fred Kramer** (New York Public Health Research Institute) *Nature Biotechnology* Volume 14: 303-308. March 1996.

Presenta una **struttura a forcina**: loop complementare al DNA target e due braccia formate da una serie di basi appaiate.



Chimiche fluorogeniche: Molecular Beacons



3. Il sistema di controlli nei test Cepheid



 **Cepheid®**
A better way.

Saggi RT-PCR standard



Positive Control
1 per run



Master Mix
1 tubes per sample

Etc....



Negative Control
1 per run

Controlli utilizzati per saggi RT-PCR standard

- **DNA Positive Control (PC) - Assay Run control**
 - **Verifica l'integrità dei reagenti**
- **DNA Negative Control (NC) - Assay Run control**
 - **Identifica eventuali problematiche di contaminazione ambientale o dei reagenti**
- **Internal control (IC) – Tube control**
 - **Identifica eventuali inibizioni della PCR e l'integrità dei reagenti.**
 - **Non compete con il DNA target**

Cepheid Assay Control Strategy

- **Ogni cartuccia GeneXpert è un dispositivo completamente chiuso e indipendente**
 - I controlli esterni hanno una capacità ridotta nel monitoraggio delle performance del test
 - Cepheid ha progettato dei sistemi molecolari specifici per avere dei controlli interni che permettano al sistema di identificare eventuali problematiche
- **La progettazione dei controlli è stata effettuata in modo tale da identificare ogni possibile problematica che possa generare un risultato falso negativo**
 - **Probe Check**
 - **Controllo di processamento del campione/Controllo interno**

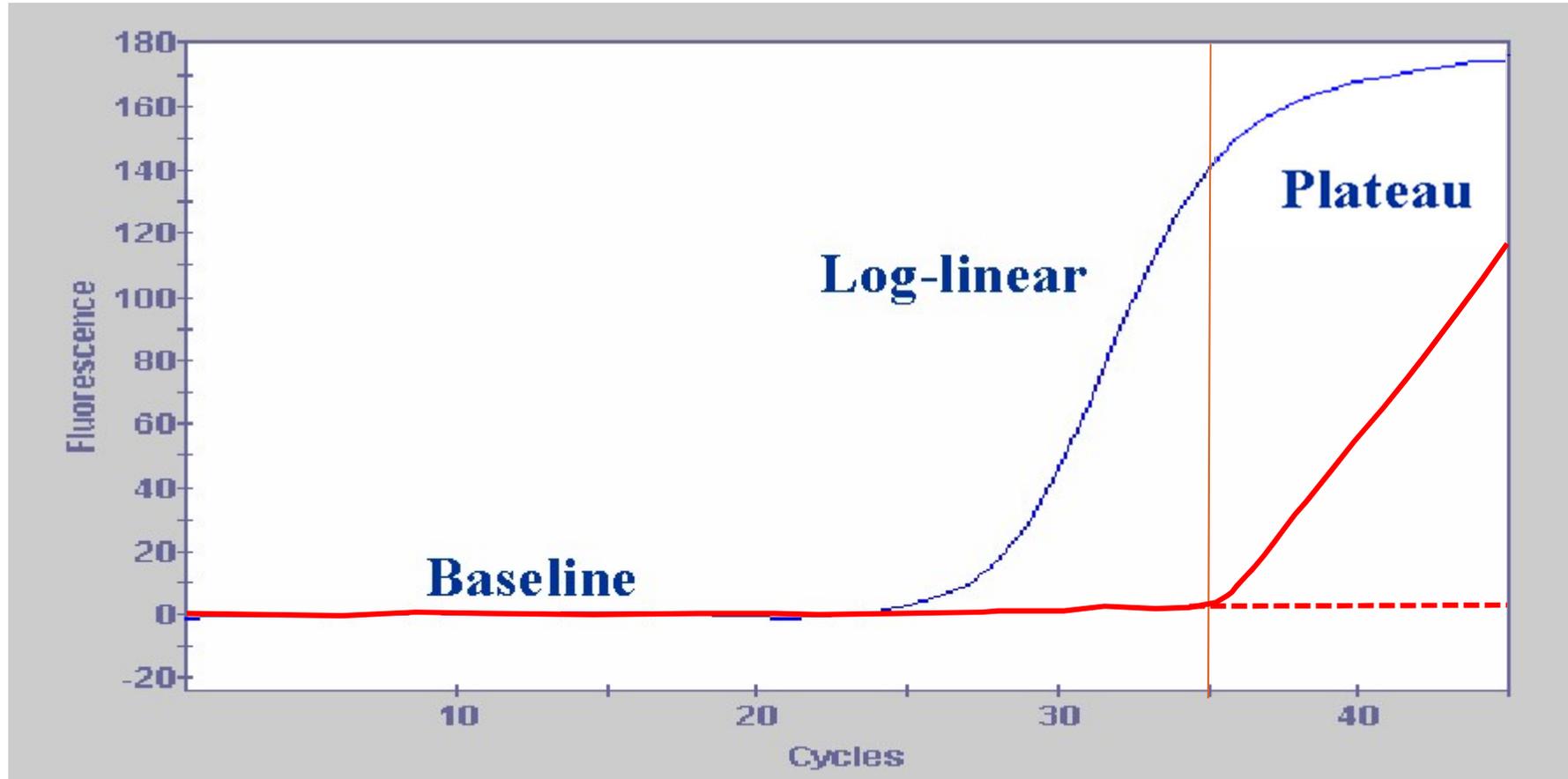
GeneXpert Real-Time PCR Assay

- **DNA Positive Control (PC) - Assay Run control**
 - **ProbeCheck**
- **DNA Negative Control (NC) - Assay Run control**
 - **Non necessario! Non c'è interfaccia tra strumento e campione, i reagenti sono già presenti all'interno della cartuccia – 1 cartuccia 1 campione!**
- **Internal control (IC) – Tube control**
 - **SPC, monitora non soltanto la fase di amplificazione ma anche l'estrazione**
 - **Non compete con il DNA target**

Specimen Processing Control (SPC)

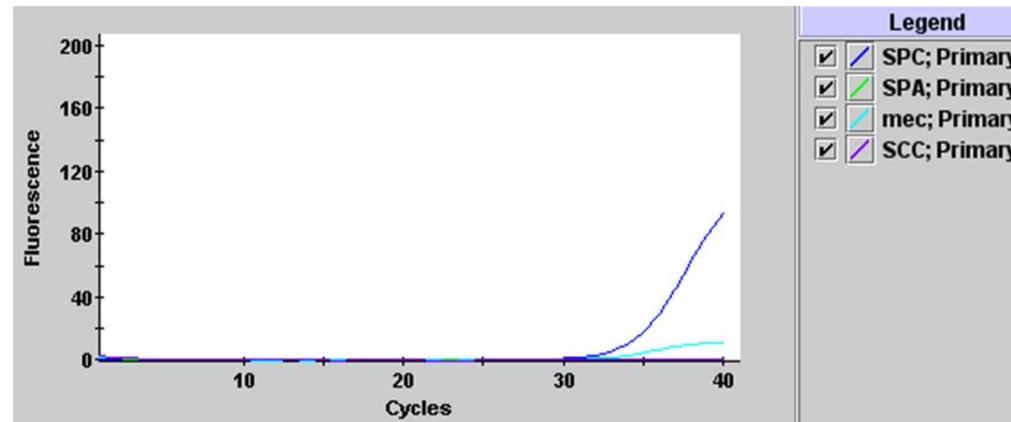
- **SPC (spore di Bacillus globigii - BG3) è un controllo interno che verifica l'efficacia delle varie fasi di trattamento del campione**
 - **Mancanza dei reagenti liofilizzati per amplificazione**
 - **Ricostituzione incompleta dei reagenti liofilizzati**
 - **Riempimento incompleto del tubo di reazione**
 - **Degradazione della TAQ polimerasi**
 - **Processamento del campione (estrazione/purificazione NA)**
 - **Inibizione della PCR**

SPC non compete con il DNA target

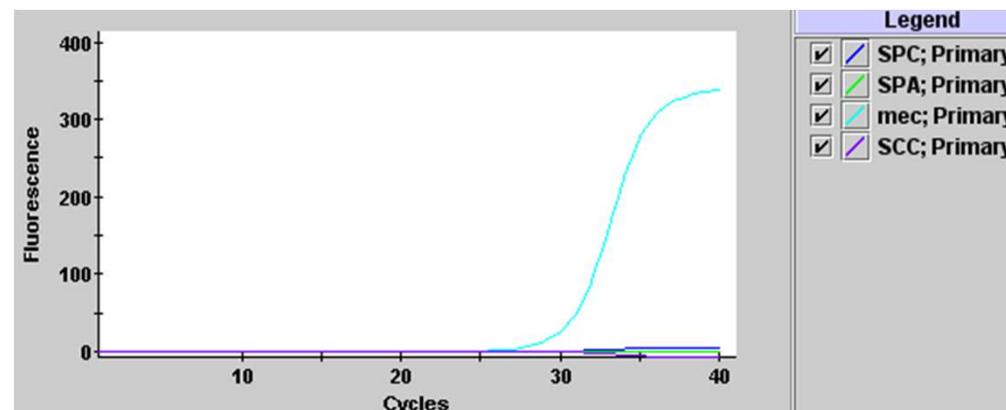


SPC non compete con il DNA target

- SPC deve essere positive quando il DNA target è negativo



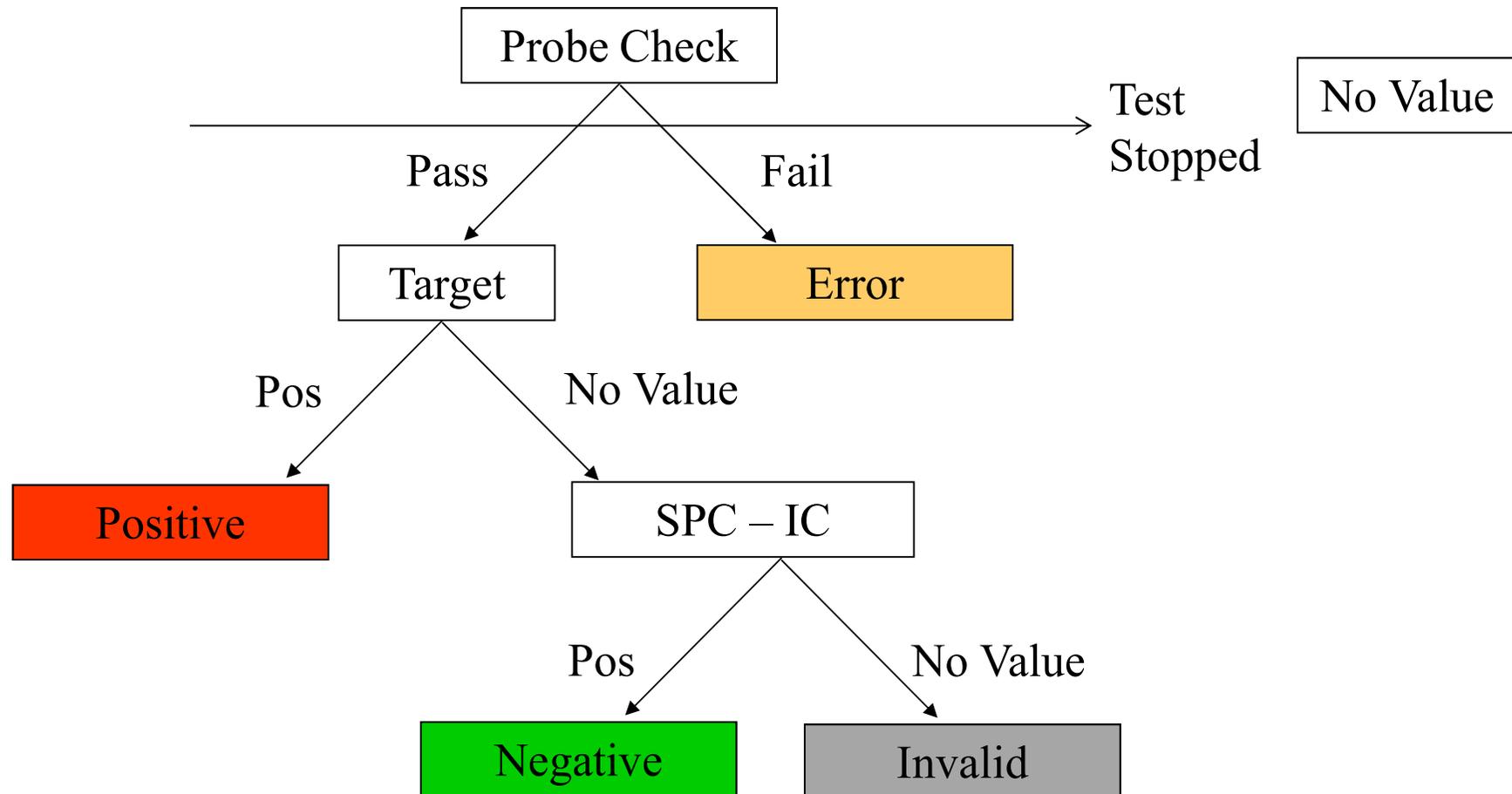
- SPC può essere positivo o negativo quando il target è positivo



Probe Check

- **Dopo la preparazione del campione, reidratazione delle beads e riempimento del tubo di reazione (prima dell'avvio della PCR), viene effettuata una lettura multipla della fluorescenza a diverse temperature**
- **Le misurazioni sono confrontate con i valori di default impostati da Cepheid**
- **Il probe check controlla:**
 - **Target Specific Reagent (TSR) beads che contengono tutti i primers, probes, e i controlli interni**
 - **Ricostituzione incompleta dei reagenti liofilizzati**
 - **Riempimento incompleto del tubo di reazione**
 - **Degradazione sonde Taqman**

Algoritmo di interpretazione dei risultati



4. Flusso di lavoro con GeneXpert Software



 **Cepheid®**
A better way.

Effettuare un test

1. Accendere il software GeneXpert
2. Selezionare **Create Test**
3. Scannerizzare o inserire manualmente il **Sample ID**
4. Scannerizzare il **codice a barre della cartuccia**
5. Selezionare **Start Test**
6. Posizionare la cartuccia nel modulo lampeggiante e chiudere la porta del modulo

Rimuovere la cartuccia quando il test è terminato

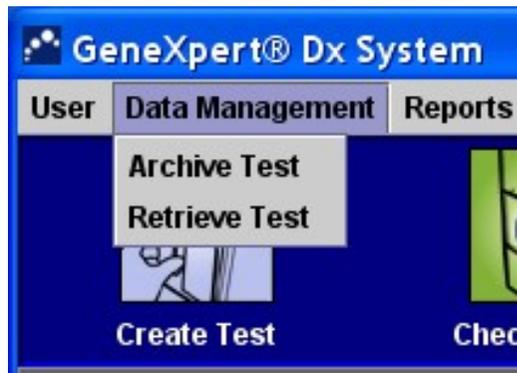
Gestione dei risultati dei test

Le funzionalità di Data management includono:

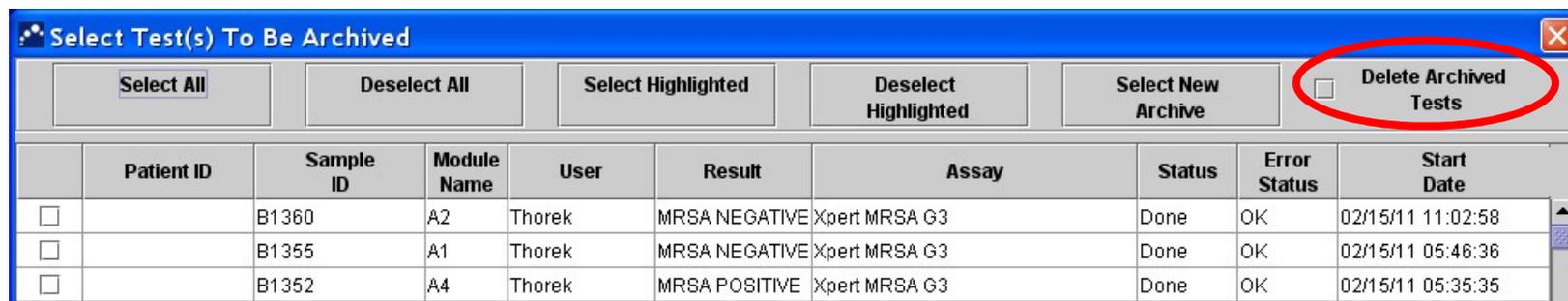
- **Archiviazione dei test**
- **Eliminazione dei test archiviati per recuperare spazio sul database**
- **Recuperare i test da un file precedentemente eliminato**
- **Creazione di test report**
- **Visualizzazione dei grafici**
- **Creazione di altri tipi di report**

Archiviazione dei test 1/2

1. Selezionare Data Management > Archive Test.



2. Selezionare i test che si desiderano archiviare.



The screenshot shows a dialog box titled 'Select Test(s) To Be Archived'. At the top, there are several buttons: 'Select All', 'Deselect All', 'Select Highlighted', 'Deselect Highlighted', 'Select New Archive', and 'Delete Archived Tests'. The 'Delete Archived Tests' button is circled in red. Below the buttons is a table with the following columns: Patient ID, Sample ID, Module Name, User, Result, Assay, Status, Error Status, and Start Date. The table contains three rows of data.

	Patient ID	Sample ID	Module Name	User	Result	Assay	Status	Error Status	Start Date
<input type="checkbox"/>		B1360	A2	Thorek	MRSA NEGATIVE	Xpert MRSA G3	Done	OK	02/15/11 11:02:58
<input type="checkbox"/>		B1355	A1	Thorek	MRSA NEGATIVE	Xpert MRSA G3	Done	OK	02/15/11 05:46:36
<input type="checkbox"/>		B1352	A4	Thorek	MRSA POSITIVE	Xpert MRSA G3	Done	OK	02/15/11 05:35:35

Archiviazione dei test 2/2

3. Selezionare **Archive**. Se si seleziona anche **Delete Archived Tests** I test selezionati saranno rimossi dal Database. Compare un messaggio di conferma dell'archiviazione



4. Selezionare **Proceed**. Compare una finestra di dialogo per il salvataggio dei dati archiviati.
5. Selezionare la cartella in cui si desidera salvare i file (.gxx) file, immettere un nome per il file da archiviare quindi cliccare **Save**.

Compare un messaggio di conferma.

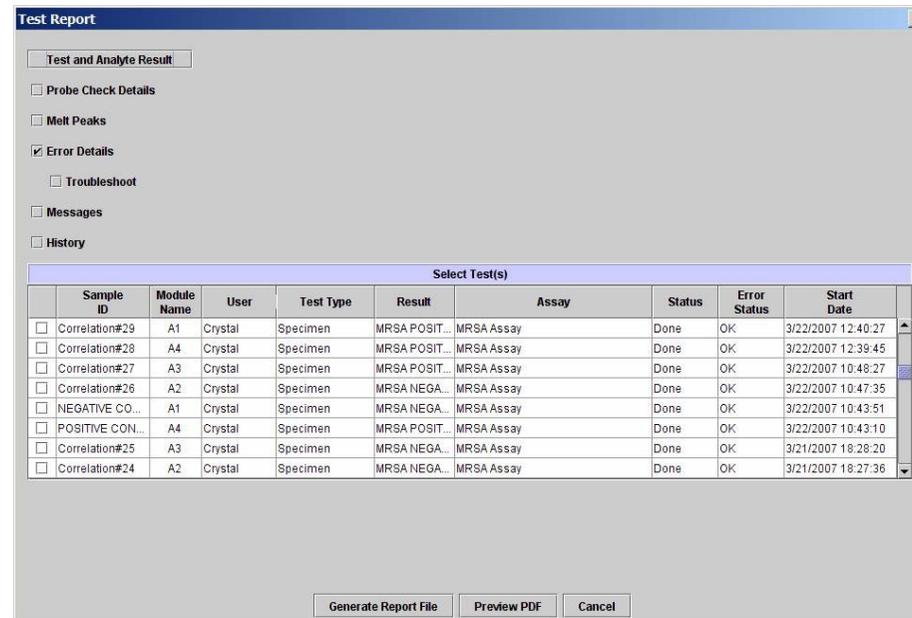
Recupero dei dati da un file archiviato

1. Selezionare **Retrieve Test** nel Data Management menu.
 - Si apre la finestra di dialogo
2. Selezionare il file archiviato (.gxx) quindi selezionare **Open**. Appare la finestra di dialogo dei test da recuperare.
 - Tests che sono già presenti nel database appaiono in rosso.
3. Selezionare I test che si desiderano recuperare.
 - Evidenzia i test quindi seleziona **Select Highlighted**.
 - Alternatively, you can select all tests by clicking **Select All**.
4. Click **Retrieve Test(s)**. A message appears and asks you to confirm the retrieval.
5. Click **Proceed**. A message appears and confirms that the tests are retrieved.

Generare un Test Report

Per generare un file PDF contenente le informazioni relative ai risultati del/dei test, selezionare **Report** nella finestra di **View Result**

- **Generate Report file:** crea un file PDF e lo salva nella cartella di default o nella cartella specificata dall'utente.
- **Preview PDF:** crea un file PDF e lo visualizza in Adobe Reader. Il file può essere salvato e/o stampato da Adobe Reader.



Esempio di Test Report

Test Report

Sample ID: RA4110190
Test Type: Specimen

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
MRSA_SA BC Assay	1	Research Use Only

Test Result: MRSA POSITIVE;
SA POSITIVE

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
BG3	0	-3	NA	PASS
SPA	12.1	104	POS	PASS
mec	12.2	-26	POS	PASS
SCC	12.4	301	POS	PASS

User: Thomas Farrell
Status: Done
Reagent Lot ID*: 00701
Expiration Date*: 12/24/2090
Cartridge S/N*: 20635133
S/W Version: 2.1
Notes:
Error Status: OK

Start Time: 8/12/2008 14:04:22
End Time: 8/12/2008 14:51:59
Module Name: A2
Module S/N: 601347
Instrument S/N: 703785

Errors
<None>

Visualizzazione dei grafici

The screenshot displays the GeneXpert Dx System software interface. The window title is "GeneXpert® Dx System". The menu bar includes "User", "Data Management", "Reports", "Setup", "View Results", and "About". The user is identified as "User <None>".

The main toolbar contains icons for "Create Test", "Check Status", "Stop Test", "View Results", "Define Assays", "Define Graphs", and "Maintenance".

The interface is divided into several sections:

- Left Panel (Metadata):** Contains fields for "Module Name" (A4), "Patient ID", "Sample ID" (B1352), "Assay" (Xpert MRSA G3), "Version" (6), "Reagent Lot ID" (05708), "Test Type" (Specimen), "Sample Type" (Other), "Other Sample Type", "Notes", "Start Time" (02/15/11 05:35:35), "End Time" (02/15/11 06:27:20), "Status" (Done), "Upload Status" (NA), and "User" (Thorek).
- Top Panel (Views):** Includes "Test Result", "Analyte Result", "Detail", "Errors", "History", and "Support".
- Right Panel (Test Details):** Shows "Assay Name" (Xpert MRSA G3), "Version" (6), and "Test Result" (MRSA POSITIVE). A note states: "For In Vitro Diagnostics Use Only."
- Bottom Panel (Graphs):** Displays a "Primary Curve" graph showing "Fluorescence" (Y-axis, 0 to 300) versus "Cycles" (X-axis, 1 to 25). The curve shows a sharp increase in fluorescence starting around cycle 19. A legend on the right indicates "SCC; Primary" and "SPC; Primary" are checked. A context menu is overlaid on the graph with options: "Save To Image File (jpg)", "Save To Image File (pdf)", and "Preview PDF".

At the bottom of the interface, there are buttons for "Save Changes", "Export", "Report", "Upload Test", "Select Graphs", and "View Test".