

Formação sobre o ensaio: Xpert[®] Carba-R

Assistência Técnica da Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid[®]**
A better way.

Agenda da formação

- **Formação sobre o Xpert Carba-R**
 - Reagentes
 - Colheita de amostras
 - Conservação e manuseamento do kit
 - Precauções
 - Preparação do cartucho
- **Controlo da qualidade**
- **Análise dos resultados**
- **Discussão e perguntas e respostas**



Objectivos da formação do Xpert Carba-R

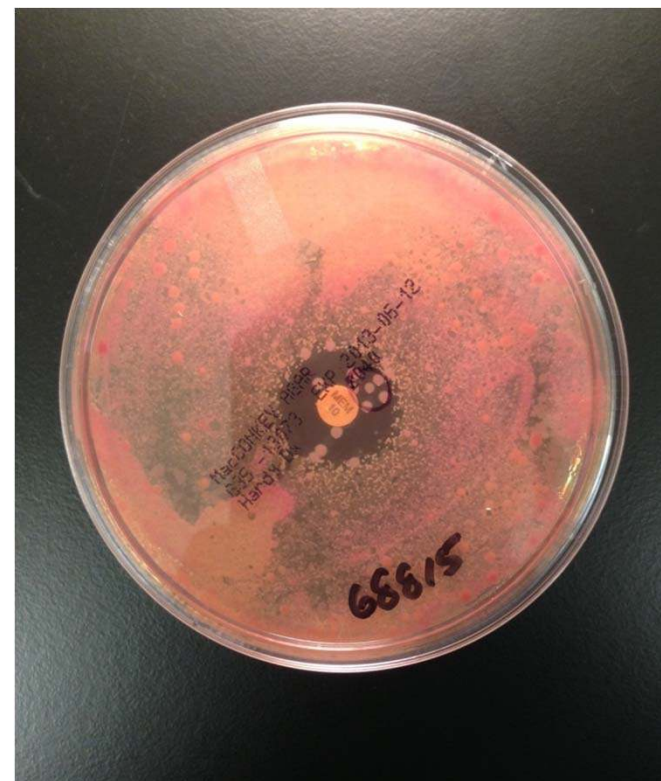
No final da formação, o utilizador será capaz de:

- **Conservar e manusear correctamente os kits de cartuchos Xpert Carba-R.**
- **Cumprir as devidas precauções de segurança no laboratório.**
- **Colher os tipos de amostra correctos e transportá-los.**
- **Realizar a preparação do cartucho e executar o ensaio.**
- **Comunicar os vários resultados gerados pelo software.**
- **Compreender a estratégia de controlo do ensaio.**

Introdução sobre o estado da doença

Em que consiste a resistência aos carbapenemos (Carba-R)?

- Os carbapenemos são um tipo de antibiótico beta-lactâmico, frequentemente utilizado como antibiótico de último recurso.
 - A resistência aos carbapenemos (Carba-R) resulta de genes de resistência cromossômica e mediada por plasmídeos altamente móveis associados a microrganismos entéricos Gram-negativos, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.
 - As infecções por microrganismos não susceptíveis a carbapenemos estão associadas a uma mortalidade elevada (até 40% a 50%).¹
 - O rastreio de doentes colonizados pode acelerar as práticas de controlo da infecção e reduzir a probabilidade de alastramento nosocomial.



¹Guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE): 2012 CRE Toolkit. Division of Healthcare Quality Promotion. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia. 2012.

A solução Cepheid



- **Detecção e diferenciação simultâneas**
 - Cinco alvos do gene Carba-R
 - Dois controlos internos para cada amostra individual
 - Controlo de processamento da amostra (SPC)
 - Controlo de verificação da sonda (PCC)
- **Sensibilidade e especificidade elevadas**
- **Simple e fácil de utilizar**
 - Sistema de cartucho fechado
- **Resultados em 48 minutos**
- **Resultados a pedido 24/7**
- **Acesso aleatório**

Utilização prevista

O Xpert Carba-R Assay da Cepheid executado nos sistemas do instrumento GeneXpert® consiste num teste diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a detecção e diferenciação rápida das sequências dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP-1} associados à não susceptibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativas obtidas a partir de amostras de zaragatoas rectais em doentes em risco de colonização intestinal com bactérias não susceptíveis a carbapenemos. O teste utiliza reacção de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. O Xpert Carba-R Assay tem como objectivo auxiliar na detecção de bactérias não susceptíveis a carbapenemos que colonizam doentes em unidades de cuidados de saúde. O Xpert Carba-R Assay não se destina a orientar ou monitorizar o tratamento de infecções bacterianas não susceptíveis a carbapenemos.

São necessárias culturas concomitantes para recuperar microrganismos para tipagem epidemiológica, teste de susceptibilidade antimicrobiana e para posterior identificação confirmatória de bactérias não susceptíveis a carbapenemos.

Requisitos do sistema e de reagentes

Sistemas GeneXpert

- **Módulos de 6 cores**
- **Software GX DX v4.3 ou superior**

Kits de teste (CE-IVD)

- **GXCARBAR-CE-10**

Kits de colheita de amostras

- **Referência Cepheid 900-0370**

Kit do Xpert Carba-R

	Ensaio Xpert Carba-R Assay
Referência	GXCARBAR-CE-10
Testes por kit	10
Conteúdo por cartucho de teste	Reagentes secos e líquidos
Pipetas de transferência	10
Frascos de reagente de amostra	10
Conservação	2 °C a 28 °C



Colheita, transporte e conservação de amostras para o Xpert Carba-R



Dispositivo de colheita da Cepheid
(referência 900-0370)

MARCA
GRAVADA

- **Tipo de amostra:**
 - **Colheita de zaragatoas rectais.**
- **Colheita da amostra:**
 - **Proceda à colheita de uma zaragatoa rectal emparelhada inserindo cuidadosamente ambas as pontas da zaragatoa aproximadamente 1 cm para além do esfíncter anal e rode suavemente.**
- **Transporte e conservação de amostras:**
 - **Imediatamente após a colheita, a zaragatoa pode ser armazenada entre 15 °C e 28 °C até um período máximo de 6 horas. Posteriormente, a zaragatoa pode ser armazenada entre 2 °C e 28 °C durante 7 dias.**

Colheita da amostra

Protocolo de colheita de amostras rectais

GeneXpert®

para utilização com os ensaios Xpert®:

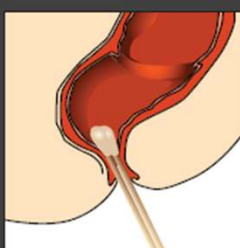
- Xpert Carba-R

1



É necessário utilizar uma dupla zaragatoa Copan Venturi Transystem para colher a amostra. Dispositivo de colheita Cepheid n.º 900-0370

2



Insira cuidadosamente ambas as pontas da zaragatoa aproximadamente 1 cm para além do esfíncter anal e rode suavemente.

3



Coloque as zaragatoas de novo no tubo.

4



Amostras que possam ser testadas no prazo de 6 horas podem ser conservadas entre 15 °C e 28 °C. As amostras conservadas entre 2 °C e 28 °C mantêm-se estáveis por um período máximo de 7 dias.

a definir diagnósticos moleculares *mediante pedido*

 **Cepheid.**
Bring answers to life.

301-3343P Rev. A, junho 2014

 **Cepheid.**

Boas Práticas de Laboratório

Configuração do laboratório de PCR

- Preparação do cartucho/reagente → Adição da amostra → Detecção

Conservação de amostras e reagentes

- Conserve as amostras separadamente dos reagentes para impedir a contaminação do reagente.

Equipamento

- Utilize pontas de pipeta filtradas, quando necessário, para diluições do CQ.
- Siga a recomendação do fabricante relativamente à calibração e manutenção do equipamento de laboratório.

Boas Práticas de Laboratório, (cont.)

Limpeza

- Limpar as superfícies de trabalho com lixívia doméstica diluída com concentração final de 1:10, seguida de uma solução de etanol a 70% ou isopropanol a 70%. Limpe as superfícies de trabalho até estarem secas.
- Caso ocorra contaminação, limpe minuciosamente a área contaminada com lixívia doméstica diluída a 1:10, DNA AWAY ou peróxido de hidrogénio a 3% (p/v) e enxagúe totalmente com água. Limpe as superfícies de trabalho até estarem secas.

Pessoal

- Use batas limpas e luvas.
- Trocar de luvas entre o processamento de amostras.

Área da bancada de laboratório

- Limpe a área da bancada de laboratório por rotina.
- Mantenha a parte traseira do instrumento sem pó.

Conservação e manuseamento do kit do Xpert Carba-R



- **Conserve os kits de teste entre 2 °C e 28 °C. Não utilizar cartuchos fora do prazo de validade.**
- **Cada cartucho de utilização única é utilizado para processar um teste. Não reutilizar cartuchos processados.**
- **Não abra um cartucho até estar pronto para adicionar a amostra eluída da zaragatoa para o cartucho.**
 - **O cartucho deve ser colocado no instrumento no espaço de 30 minutos após adicionar a amostra ao interior do cartucho.**
- **A contaminação cruzada durante as etapas de manuseamento de amostras deve ser evitada.**
 - **Troque de luvas entre o processamento de cada amostra.**
 - **Trocar de luvas antes de sair e quando entrar na área de trabalho.**
- **Não utilize um cartucho que tiver caído depois de o ter retirado da embalagem.**
- **Não agite o cartucho. Agitar ou deixar cair o cartucho após a abertura da respectiva tampa pode produzir resultados inválidos.**
- **Não utilizar um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.**

Preparação do cartucho do Xpert Carba-R

Preparação do cartucho Xpert® – Carba-R

Consulte o folheto informativo para obter instruções detalhadas, precauções e advertências.

Poderá obter um exemplar da FDS em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

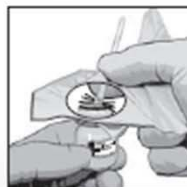
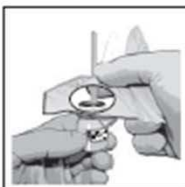
Assistência Técnica da Cepheid

Filial nos EUA
(888) 838-3222
techsupport@cepheid.com

Filial na Europa
+33 563 82 53 19
support@cepheid-europe.com



- 1 Adquira um cartucho Xpert e um frasco de reagente de amostra para cada amostra.
- 2 Insira a zaragatoa no frasco de reagente de amostra.
- 3 Parta a zaragatoa pelo entalhe junto à abertura do frasco.
- 4 Coloque novamente a tampa no frasco de reagente de amostra e misture durante 10 segundos.
- 5 Abra a tampa do cartucho Xpert.
- 6 Aspire o reagente de amostra até à linha na pipeta fornecida.
- 7 Esvoazie a pipeta para a câmara de amostras.
- 8 Feche a tampa do cartucho Xpert.
- 9 Inicie o teste dentro do período indicado no folheto informativo.



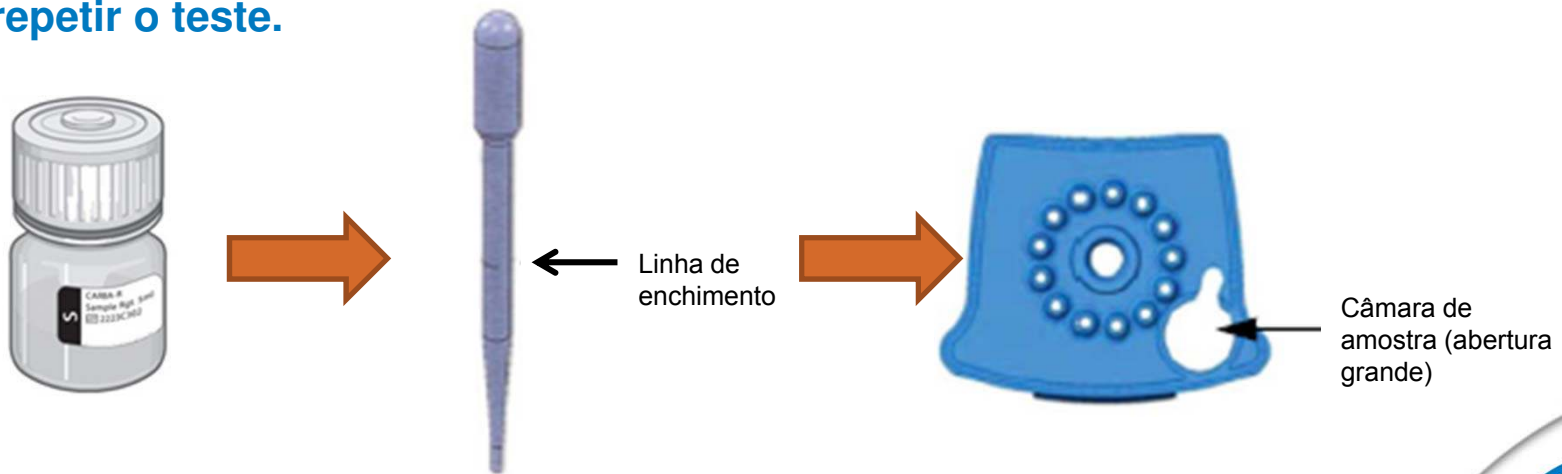
Nota: Não segure na zaragatoa por baixo do entalhe. Utilize gaze ou equivalente para minimizar o risco de contaminação.

© 2014 Cepheid

301-1020P Rev 2 Julho 2014

Execução do teste

- Coloque uma única zaragatoa no frasco do reagente de amostras; quebre na marca gravada utilizando gaze estéril para minimizar os riscos de contaminação.
 - Coloque novamente a zaragatoa não utilizada no tubo de transporte e conserve entre 2 °C e 28 °C.
- Coloque o reagente de amostras no agitador de vórtex durante 10 segundos a velocidade elevada.
- Abra o frasco do Reagente de amostra.
- Encha a pipeta de transferência até à marca na pipeta.
 - Evitar bolhas de ar.
 - A amostra que resta no frasco de reagente de amostra pode ser conservada entre 2 °C e 28 °C até 4 dias a contar do dia de colheita caso seja necessário repetir o teste.



Execução do teste



Controlo da qualidade

Consultar o folheto informativo para obter mais detalhes



 **Cepheid**[®]
A better way.

Estratégia de controlo do ensaio Cepheid

- **Cada cartucho Expert constitui um dispositivo de teste autónomo.**
 - **A Cepheid concebeu métodos moleculares específicos de modo a incluir controlos internos que permitem ao sistema detectar modos de falha específicos em cada cartucho.**
 - **Controlo do sistema do instrumento: Estado da verificação**
 - **Controlo dos reagentes: Verificação da sonda**
 - **Controlo de processamento da amostra: SPC e/ou SAC**
 - **Controlo de amplificação: SPC e/ou SAC e/ou CI**

Controlo do sistema do instrumento – Estado da verificação

- **O controlo do sistema do instrumento verifica o sistema óptico, a temperatura do módulo e a integridade mecânica de cada cartucho.**
 - **Se os controlos do sistema falharem, há indicação de ERRO para o resultado do teste.**

Controlo do reagente – Controlo de verificação da sonda

- Após a preparação da amostra, a reconstituição das esferas e o enchimento dos tubos (antes da termociclagem), são efectuadas múltiplas leituras da fluorescência a diferentes temperaturas.
- As leituras são comparadas com os valores predefinidos estabelecidos pela Cepheid.
- A verificação da sonda controla:
 - A ausência de esferas de reagente específico para o alvo (TSR) e/ou de reagente enzimático, que contêm todos os iniciadores, sondas e modelo de controlo interno
 - A reconstituição incompleta do reagente
 - O enchimento incompleto do tubo de reacção
 - A degradação da sonda
- Se a verificação da sonda falhar, surge a indicação de ERRO para o resultado do teste.

Controlo de processamento da amostra - SPC

- O controlo de processamento da amostra (SPC) avalia a eficácia dos passos de preparação da amostra, incluindo o enchimento do tubo de reacção.
- O SPC consiste em esporos de *Bacillus globigii*.
- O SPC controla:
 - A ausência de esferas de iniciador/sonda ou enzima
 - A reconstituição incompleta do reagente
 - O enchimento incompleto do tubo de reacção
 - A degradação das enzimas
 - A lise da amostra, a extracção do ácido nucleico e a integridade deste
 - A inibição da amostra
- O SPC pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva para o analito.
- Se o SPC falhar numa amostra negativa para o analito, surge a indicação de INVÁLIDO para o resultado do teste.

Controlos externos disponíveis no mercado

Nome do microrganismo	Beta-lactamases presentes	Fonte
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	NCTC 13438
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ATCC BAA-1705
<i>Escherichia coli</i>	IMP	NCTC 13476
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-10	NCTC 13437
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	NCTC 13439
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	NCTC 13440
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	NCTC 13443
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	ATCC BAA-2146
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	NCTC 13442

- **Outras opções:**
 - **Amostras de doentes comprovadamente positivas e negativas**

Análise dos resultados

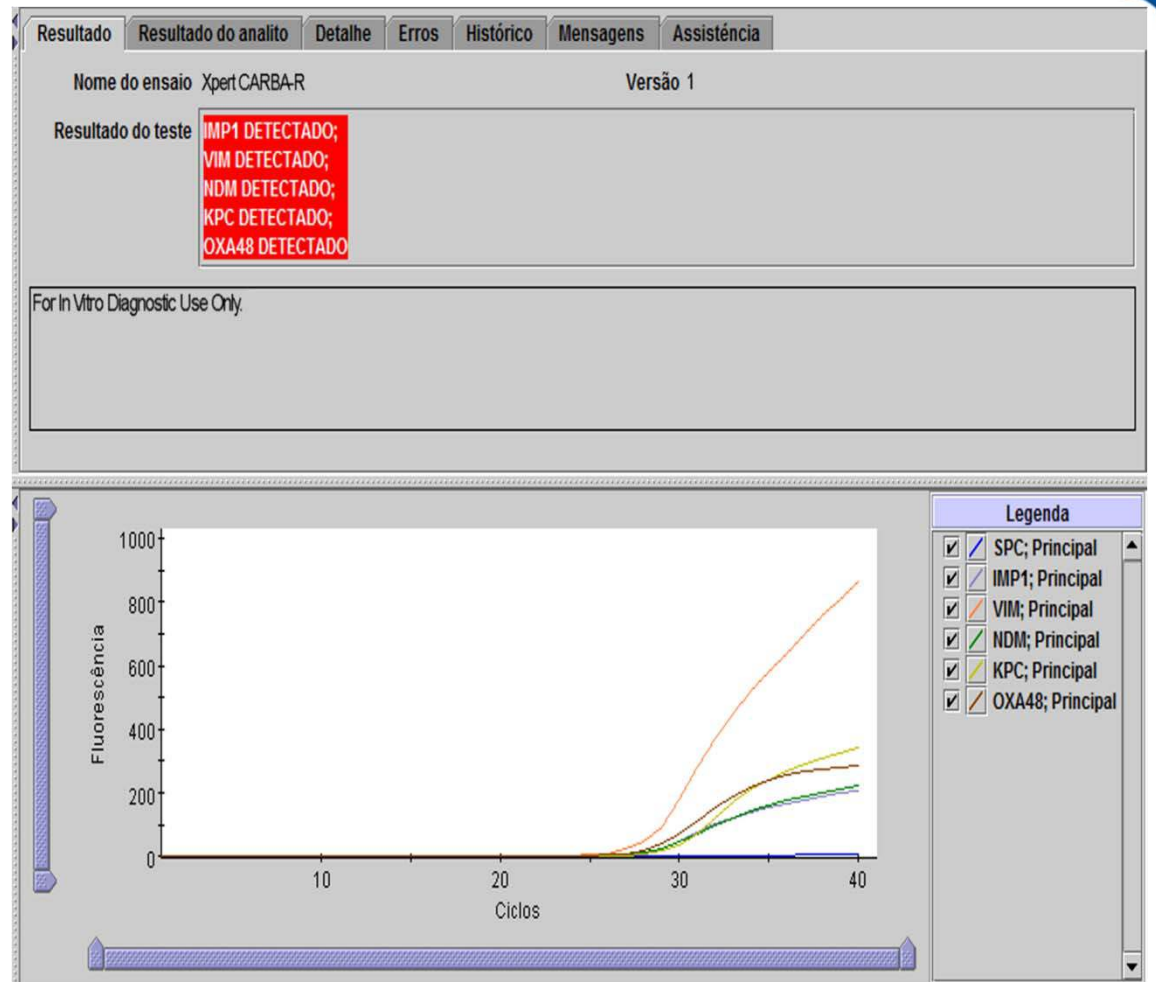
Consultar o folheto informativo para obter mais detalhes



 **Cepheid**[®]
A better way.

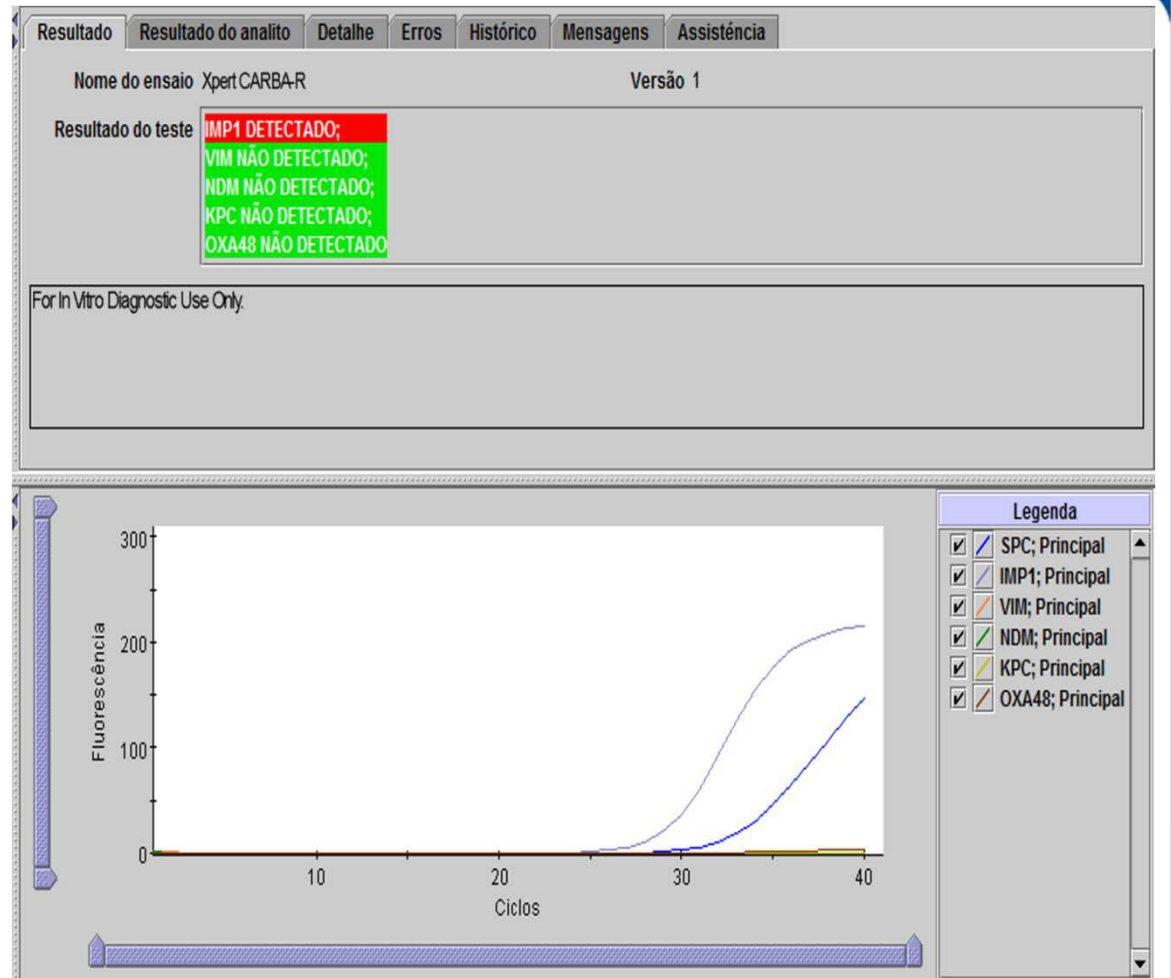
Resultados do Xpert Carba-R: IMP1 Pos./VIM Pos./NDM Pos./KPC Pos./OXA48 Pos.

- As sequências do ADN-alvo de IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 são detectadas.
- SPC: Não aplicável (N/A). O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo de IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 podem interferir com este controlo.
- Verificação da sonda – PASSA. Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.



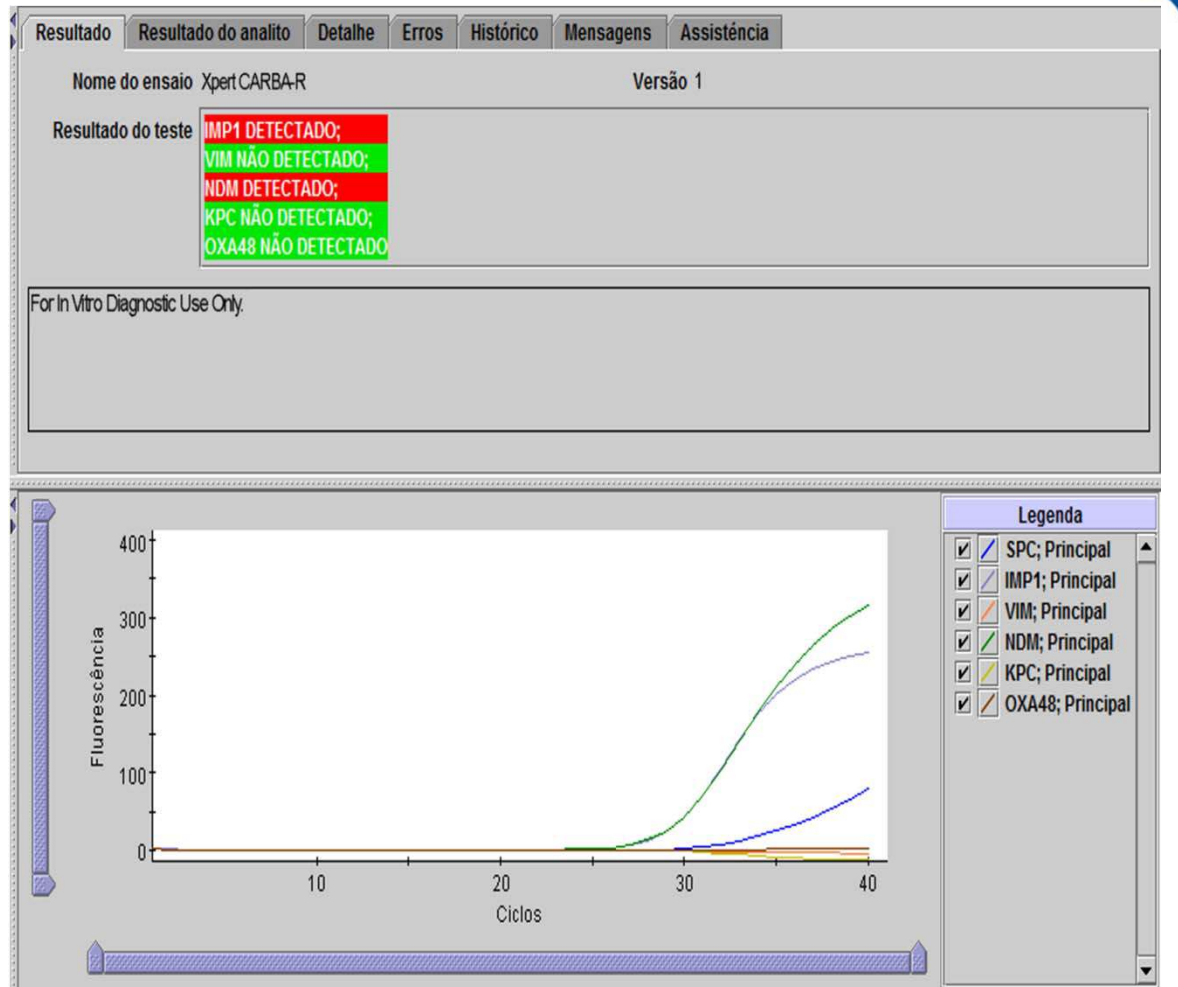
Resultados do Xpert Carba-R: IMP1 Pos./VIM Neg./NDM Neg./KPC Neg./OXA48 Neg.

- A sequência do ADN-alvo IMP1 é detectada; As sequências do ADN-alvo de VIM, NDM, KPC e OXA48 não são detectadas.
- SPC: Não aplicável (N/A). O SPC é ignorado porque a amplificação do ADN-alvo de IMP1 pode interferir com este controlo.
- Verificação da sonda – PASSA. Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.



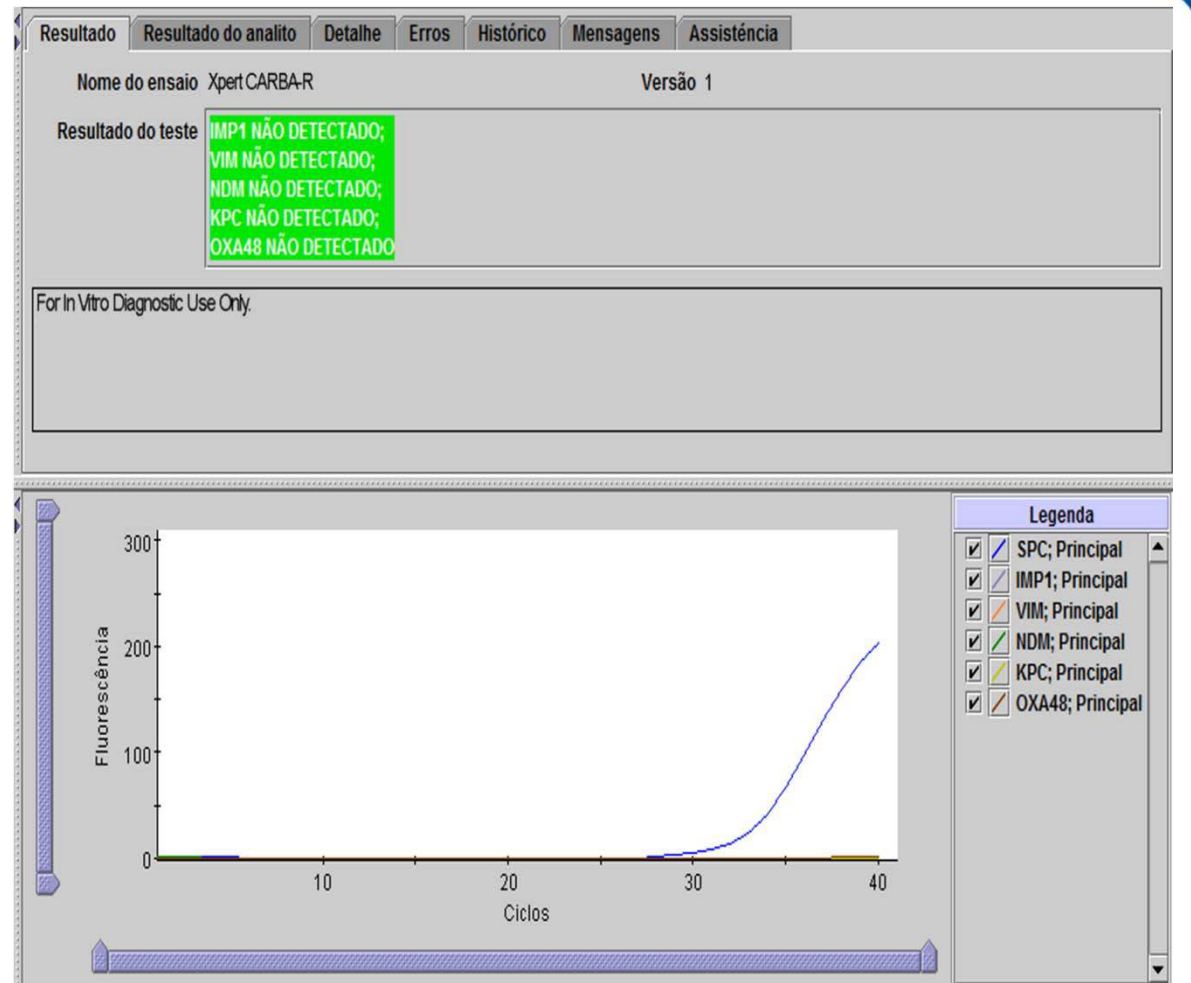
Resultados do Xpert Carba-R: IMP1 Pos./VIM Neg./NDM Pos./KPC Neg./OXA48 Neg.

- As seqüências do ADN-alvo de IMP1 e NDM são detectadas; as seqüências do ADN-alvo VIM, KPC e OXA48 não são detectadas.
- SPC: Não aplicável (N/A). O SPC é ignorado porque as amplificações do ADN-alvo de IMP1 e NDM podem interferir com este controlo.
- Verificação da sonda – PASSA. Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.



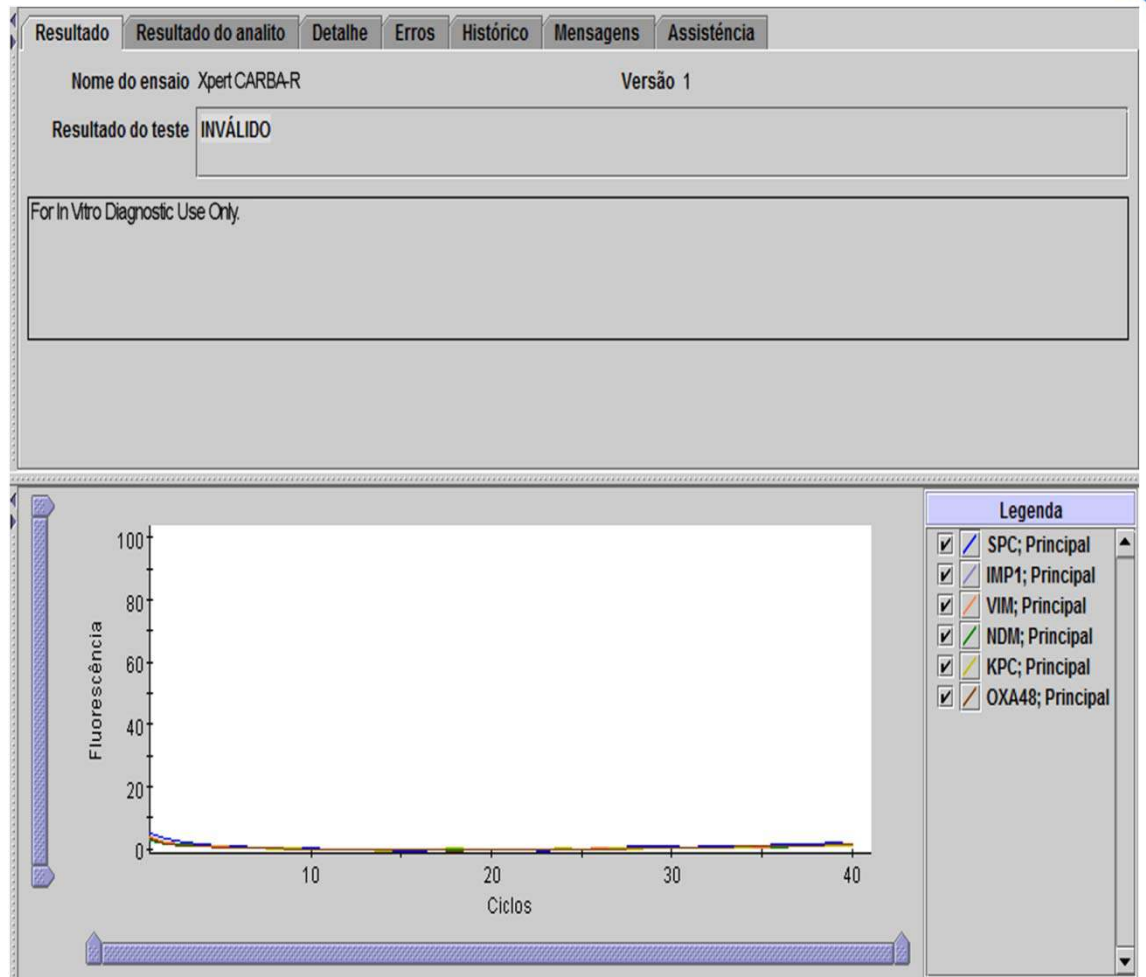
Resultados do Xpert Carba-R: IMP1 Neg./VIM Neg./NDM Neg./KPC Neg./OXA48 Neg.

- As sequências do ADN-alvo IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 não são detectadas.
- SPC: PASSA; a amplificação por PCR do SPC da sequência do ADN do SPC apresenta um valor de Ct dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) de fluorescência superior à definição mínima.
- Verificação da sonda – PASSA. Aprovados todos os resultados de verificação da sonda.



Resultados do Xpert Carba-R: INVÁLIDO

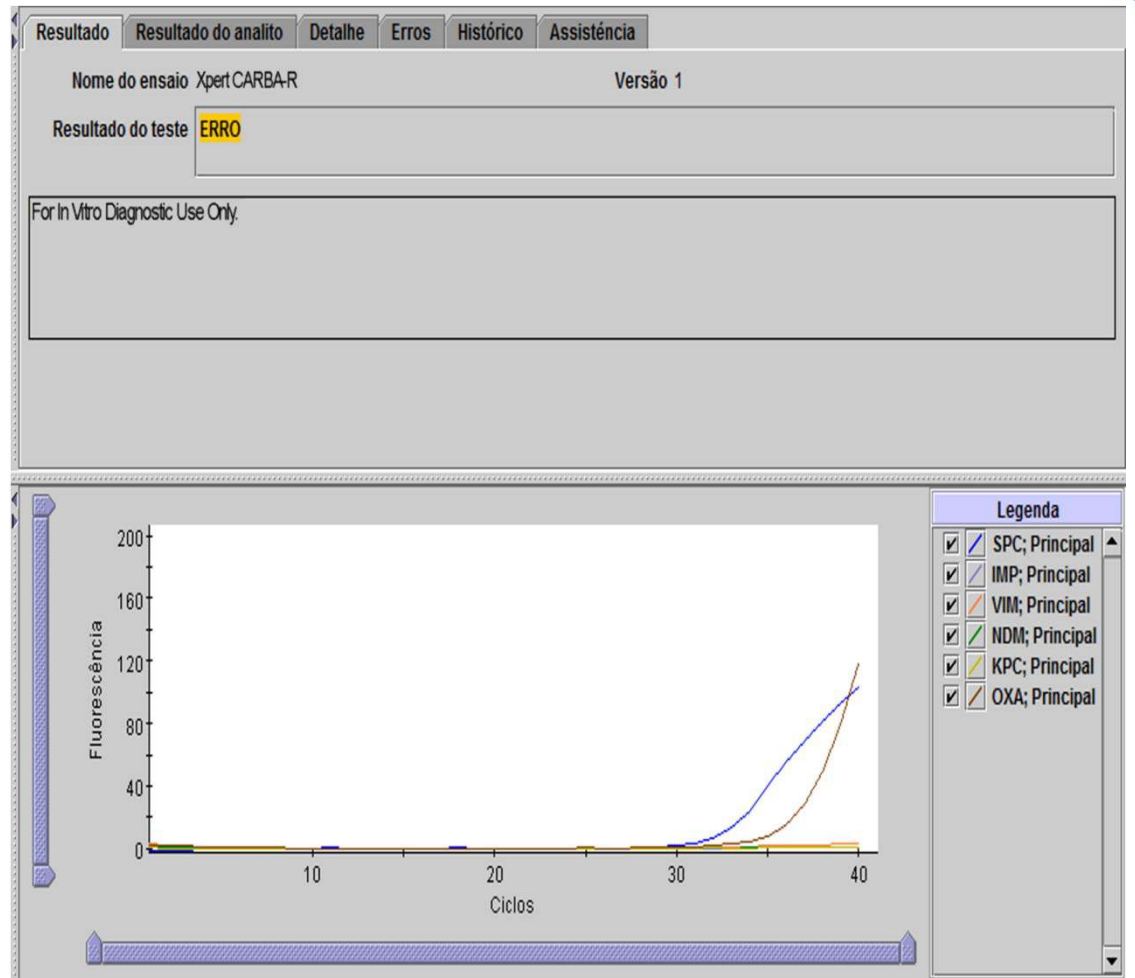
- A presença ou ausência de seqüências do ADN-alvo de IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 não pode ser determinada.
- SPC: FALHA; sem amplificação por PCR da seqüência do ADN do SPC ou o Ct do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) de fluorescência é inferior à definição mínima.
- PCC: APROVADO; todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.



Resultado do Xpert Carba-R: ERRO

- A presença ou ausência de sequências do ADN-alvo de IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 não pode ser determinada.
- SPC: SEM RESULTADO
- PCC: FALHOU*; um ou todos os resultados de verificação da sonda falharam. O PCC falhou provavelmente porque o tubo de reacção não foi adequadamente enchido ou porque foi detectado um problema de integridade da sonda.

* Se a verificação da sonda foi aprovada, o erro é causado pela falha de um dos componentes do sistema.



Resultado do Xpert Carba-R: SEM RESULTADO

- Não é possível determinar a presença ou ausência de ADN-alvo de Carba-R. Recorra às instruções na secção 13 **Procedimento para repetição de teste** no folheto informativo para repetir o teste. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste (por exemplo, o utilizador parou um teste que estava em curso).
- SPC: SEM RESULTADO
- PCC: Não aplicável

Motivos para repetir um ensaio

- Um resultado **INVÁLIDO** indica que o controlo do SPC falhou. A amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida.
- Um resultado **ERRO** indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado, possivelmente devido ao tubo de reacção não ter sido adequadamente enchido, à detecção de um problema de integridade da sonda de reagente ou a terem sido excedidos os limites de pressão máxima.
- **SEM RESULTADO** indica que foram colhidos dados insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.






Factores que afectam negativamente os resultados

- **Colheita incorrecta da amostra**
 - Não foi avaliado o desempenho com outros dispositivos de colheita e tipos de amostra.
 - No caso de ensaios que contenham o controlo SAC, uma amostra que não contenha células humanas origina um resultado inválido do teste.
- **Transporte ou conservação incorrectos da amostra colhida**
 - As condições de transporte e conservação são específicas para cada amostra.
 - Consultar o folheto informativo para obter as instruções de manuseamento correctas.
- **Procedimento de análise incorrecto**
 - A modificação dos procedimentos de análise pode alterar o desempenho do teste.
 - Erros técnicos ou a troca de amostras podem afectar os resultados do teste.
 - Para se evitarem resultados incorrectos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções do folheto informativo.
- **Substância interferente**
 - Podem observar-se resultados falsos negativos ou resultados inválidos no teste na presença de uma substância interferente.
- **O número de microrganismos na amostra é inferior ao limite de detecção do teste**
- **Consultar o folheto informativo para obter a taxa de indeterminados**

Substâncias que interferem

- **Das 23 substâncias potencialmente inibidoras testadas, o Pepto-Bismol a 0,25% p/v apresentou um efeito inibidor estatisticamente significativo na detecção de IMP-1 no ensaio Xpert Carba-R Assay. Não foram observados outros efeitos inibidores estatisticamente significativos.**
- **Consulte o folheto informativo do Xpert Carba-R para obter dados adicionais sobre substâncias potencialmente interferentes.**

Procedimento de repetição de teste do Carba-R

1	Elimine o cartucho usado.	
2	Do kit de teste, remova os seguintes artigos novos: cartucho do Xpert Carba-R, frasco de reagente de amostra e pipeta de transferência.	
3	Transfira o líquido restante do frasco de reagente de amostra original (conservado por um período ≤ 4 dias entre 2 °C e 8 °C) para o novo frasco de reagente de amostra.	
4	Repita o teste com um cartucho novo.	
5	Seguir as instruções do folheto informativo sobre a execução de um teste.	

Discussão e perguntas e respostas



 **Cepheid**[®]
A better way.

Assistência Técnica

- **A Cepheid presta assistência técnica no local e por telefone, fax e e-mail.**
- **América do Norte:**
 - **Telefone: +1 (888) 838-3222**
 - **Fax: +1 (408) 716-2550**
 - **E-mail: techsupport@cepheid.com**
- **Europa, África, Médio Oriente, Península Indiana:**
 - **Telefone:**
 - França: +33 563 825 319**
 - Alemanha: +49 69 710 480 480**
 - Reino Unido: +44 3303 332 533**
 - África do Sul: +27 11 234 9636**
 - Austrália, Nova Zelândia: +61 1800 107 884**
 - Outros países da Europa, do Médio Oriente e de África: +971 4 253 3218**
 - **Fax: +33 563 825 301**
 - **E-mail: support@cepheideurope.com**

Discussão e perguntas e respostas

