

Formation relative au test : Xpert[®] Carba-R

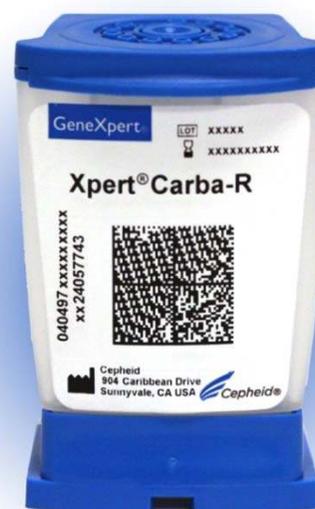
Service d'assistance technique de Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid[®]**
A better way.

Programme de la formation

- **Formation Xpert Carba-R**
 - Réactifs
 - Prélèvement de l'échantillon
 - Conservation et manipulation
 - Précautions
 - Préparation de la cartouche
- **Contrôle qualité**
- **Analyse des résultats**
- **Débat et questions-réponses**



Objectifs de la formation Xpert Carba-R

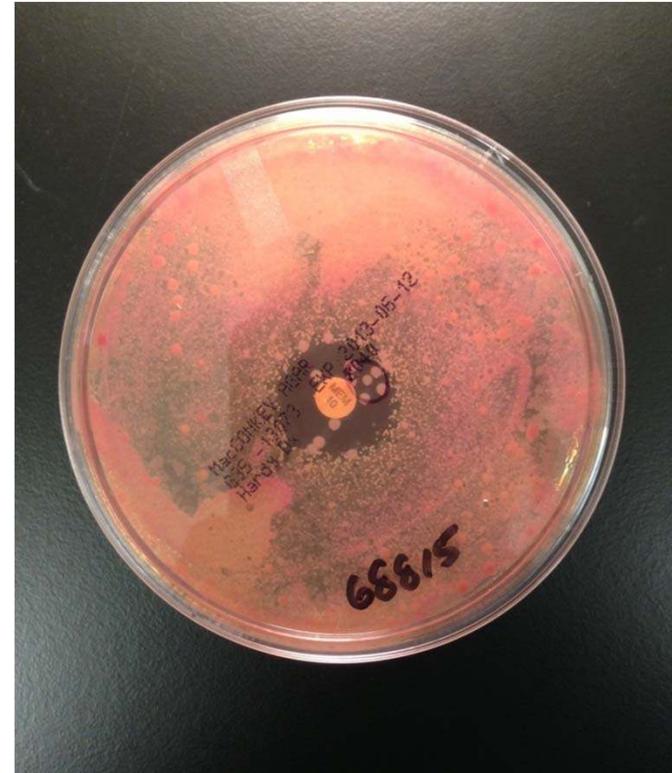
À la fin de la formation, l'utilisateur sera en mesure de :

- **Conserver et manipuler correctement les kits de cartouche Xpert Carba-R.**
- **Suivre les précautions correctes de sécurité en laboratoire.**
- **Prélever les types d'échantillon appropriés et transporter l'échantillon.**
- **Effectuer la préparation de la cartouche et réaliser le test.**
- **Rapporter les divers résultats générés par le logiciel.**
- **Comprendre la stratégie de contrôle du test.**

Introduction sur la pathologie

Qu'est-ce que la résistance aux carbapénèmes (Carba-R) ?

- **Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques appartenant aux bêta-lactamines. Elles sont souvent utilisées en dernier recours.**
 - **La résistance aux carbapénèmes (Carba-R) provient de gènes de résistance chromosomiques ou médiés par des plasmides très mobiles et associés à des micro-organismes entériques à Gram négatif, Pseudomonas et Acinetobacter.**
 - **Les infections par des micro-organismes non sensibles aux carbapénèmes sont associées à une mortalité élevée (jusqu'à 40-50 %).¹**
 - **Le dépistage des patients colonisés permet d'accélérer les procédures de lutte contre l'infection et de réduire le risque de diffusion nosocomiale.**



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.

La solution Cepheid



- **Détection et différenciation simultanées**
 - Cinq cibles de gènes Carba-R
 - Deux contrôles internes pour chaque échantillon individuel
 - Contrôle de traitement de l'échantillon (CTE)
 - Contrôle de vérification de la sonde (CVS)
- **Sensibilité et spécificité élevées**
- **Facilité et simplicité d'utilisation**
 - Système de cartouche fermée
- **Résultats obtenus en 48 minutes**
- **Résultats à la demande, 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7**
- **Accès aléatoire**

Utilisation prévue

Le test Cepheid Xpert Carba-R Assay, réalisé sur les systèmes d'instruments GeneXpert[®], est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* conçu pour détecter et différencier rapidement les séquences des gènes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} et *bla*_{IMP-1} associées à la non-sensibilité aux carbapénèmes des bactéries à Gram négatif isolées dans des échantillons d'écouvillons rectaux de patients exposés à un risque de colonisation intestinale par des bactéries non sensibles aux carbapénèmes). Le test utilise une réaction en chaîne par polymérase (PCR) automatisée et en temps réel. Le test Xpert Carba-R Assay est conçu pour aider à la détection des bactéries non sensibles aux carbapénèmes qui colonisent les patients dans les structures de soins de santé. Le test Xpert Carba-R Assay n'est pas destiné à guider ou à surveiller le traitement des infections par des bactéries non sensibles aux carbapénèmes.

Il est nécessaire de réaliser en parallèle des cultures pour isoler les organismes à des fins de typage épidémiologique, d'analyse de la sensibilité aux antibiotiques et de confirmation supplémentaire de l'identification des bactéries non sensibles aux carbapénèmes.

Exigences du système et des réactifs

Systemes GeneXpert

- **Modules à six couleurs**
- **Logiciel GX DX version 4.3 ou supérieure**

Kits de test (CE-IVD)

- **GXCARBAR-CE-10**

Kits de prélèvement d'échantillon

- **Référence catalogue Cepheid 900-0370**

Kit Xpert Carba-R

	Test Xpert Carba-R Assay
Référence catalogue	GXCARBAR-CE-10
Tests par kit	10
Contenu par cartouche de test	Réactifs secs et liquides
Pipettes de transfert	10
Flacons de réactif échantillon	10
Conservation	2 °C - 28 °C



Prélèvement, transport et conservation de l'échantillon pour Xpert Carba-R



Cepheid Sample Collection Device (dispositif de prélèvement Cepheid) (numéro de référence 900-0370)

↑
MARQUE

- **Type d'échantillon :**
 - **Prélèvement avec écouvillon rectal**
- **Prélèvement de l'échantillon :**
 - **Recueillir un double écouvillon rectal en insérant soigneusement les deux embouts de l'écouvillon à environ 1 cm au-delà du sphincter anal et en les faisant tourner doucement.**
- **Transport et conservation de l'échantillon :**
 - **Immédiatement après le prélèvement, l'échantillon de l'écouvillon peut être conservé entre 15 °C et 28 °C pendant 6 heures au maximum. Ensuite, l'écouvillon peut être conservé entre 2 °C et 28 °C pendant 7 jours.**

Prélèvement de l'échantillon

Protocole de prélèvement d'échantillon rectal

GeneXpert®

à utiliser avec les tests Xpert® :

- Xpert Carba-R

1



Un système Venturi Transystem à deux écouvillons de Copan doit être utilisé pour le recueil de l'échantillon. Dispositif de recueil de Cepheid, n° 900-0370

2



Insérer avec précaution les deux extrémités de l'écouvillon sur environ 1 cm, au-delà du sphincter anal et tourner délicatement.

3



Remettre les écouvillons dans le tube.

4



Les échantillons qu'il est possible de tester dans les 6 heures qui suivent leur prélèvement peuvent être conservés entre 15 °C et 28 °C. Les échantillons conservés à une température comprise entre 2 °C et 28 °C sont stables jusqu'à 7 jours.

définition des diagnostics moléculaires *à la demande*

 **Cepheid.**
Bring answers to life.

301-3343F Rev. A, Jan 2014

 **Cepheid.**

Bonnes pratiques de laboratoire

Configuration du laboratoire de PCR

- Préparation de la cartouche/du réactif → Ajout de l'échantillon → Détection

Conservation des échantillons et des réactifs

- Conserver les échantillons séparément des réactifs pour éviter de contaminer les réactifs.

Matériel

- Utiliser des embouts de pipette avec filtre, si nécessaire, pour les dilutions de CQ.
- Suivre les recommandations du fabricant pour l'étalonnage et la maintenance du matériel de laboratoire.

Bonnes pratiques de laboratoire, suite

Nettoyage

- Nettoyer les surfaces de travail avec une dilution d'eau de Javel domestique au 1/10, puis avec une solution d'éthanol à 70 % ou d'isopropanol à 70 %. Essuyer les surfaces de travail pour les sécher.
- En cas de contamination, nettoyer minutieusement la zone contaminée avec une dilution d'eau de Javel domestique au 1/10, avec du DNA AWAY ou du peroxyde d'hydrogène à 3 % (m/v), puis rincer minutieusement avec de l'eau. Essuyer les surfaces de travail pour les sécher.

Personnel

- Porter une blouse propre et des gants.
- Changer de gants d'un échantillon à l'autre.

Paillasse

- Nettoyer régulièrement la paillasse.
- Veiller à ce qu'il n'y ait pas de poussière à l'arrière de l'instrument.

Conservation et manipulation du kit Xpert Carba-R



- **Conserver les kits de tests entre 2 °C et 28 °C Ne pas utiliser de cartouches périmées.**
- **Chaque cartouche à usage unique est utilisée pour effectuer un test. Ne pas réutiliser des cartouches usagées.**
- **Ne pas ouvrir une cartouche avant d'être prêt à ajouter l'échantillon élué de l'écouvillon dans la cartouche.**
 - **La cartouche doit être placée dans l'instrument dans les 30 minutes suivant l'ajout de l'échantillon dans la cartouche.**
- **Éviter toute contamination croisée pendant les étapes de manipulation des échantillons.**
 - **Changer de gants entre chaque échantillon.**
 - **Changer de gants avant de quitter la zone de travail et au moment d'entrer dans la zone de travail.**
- **Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée après l'avoir retirée de son emballage.**
- **Ne pas agiter la cartouche. L'agitation ou la chute de la cartouche après l'ouverture de son couvercle peut conduire à des résultats non valides.**
- **Ne pas utiliser une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.**

Préparation de la cartouche Xpert Carba-R

Préparation de la cartouche Xpert® - Carba-R

Consulter la notice pour obtenir les instructions détaillées, les précautions et les avertissements.

Pour obtenir un exemplaire de la fiche technique de données de sécurité (SDS, Safety Data Sheet), consulter : www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

Service d'assistance technique de Cepheid

Bureau aux États-Unis
(888) 838-3222

techsupport@cepheid.com

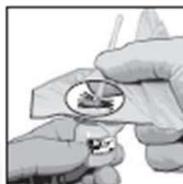
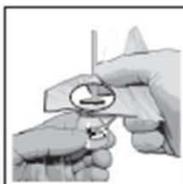
Bureau en Europe

+33 563 82 53 19

support@cepheid europe.com



- 1 Se procurer une cartouche Xpert et un flacon de réactif échantillon pour chaque échantillon.
- 2 Insérer l'écouvillon dans le flacon de réactif échantillon.
- 3 Casser l'écouvillon au niveau de la rainure près de l'ouverture du flacon.
- 4 Reboucher le flacon de réactif échantillon et agiter au vortex pendant 10 secondes.
- 5 Ouvrir le couvercle de la cartouche Xpert.
- 6 Aspirer le réactif échantillon jusqu'au trait indiqué sur la pipette fournie.
- 7 Vider la pipette dans la chambre de l'échantillon.
- 8 Fermer le couvercle de la cartouche Xpert.
- 9 Démarrer le test dans le délai précisé dans la notice.



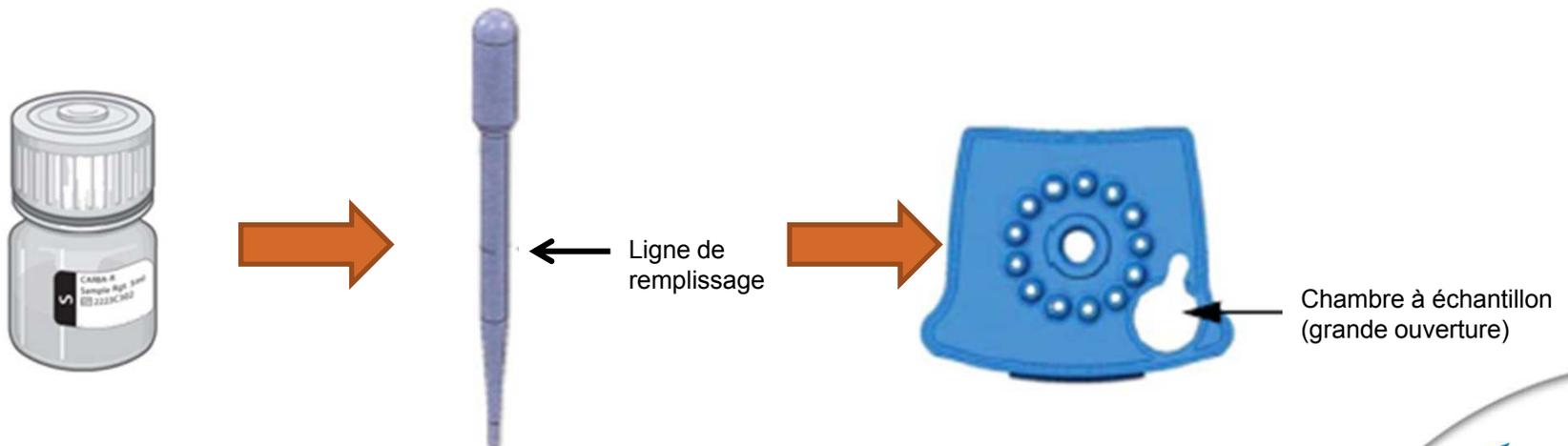
Remarque : Ne pas tenir l'écouvillon en dessous de la rainure. Utiliser de la gaze ou un équivalent pour minimiser le risque de contamination.

© 2014 Cepheid

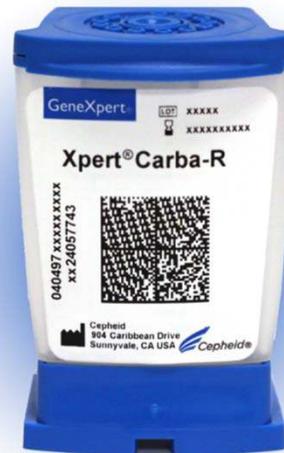
301-3342F Rev. A Juillet 2014

Réalisation du test

- Placer un écouvillon simple dans le flacon de réactif échantillon ; le casser au niveau de la marque en utilisant une gaze stérile pour réduire les risques de contamination.
 - Mettre l'écouvillon non utilisé dans le tube de transport et le conserver entre 2 °C et 28 °C.
- Agiter au vortex le flacon de réactif échantillon pendant 10 secondes, à vitesse élevée.
- Ouvrir le flacon de réactif échantillon.
- Remplir la pipette de transfert jusqu'à la marque sur la pipette.
 - Éviter les bulles d'air.
 - L'échantillon restant dans le flacon de réactif échantillon peut être gardé entre 2 °C et 28 °C pendant un maximum de 4 jours dans le cas où une répétition du test serait nécessaire.



Réalisation du test



Contrôle qualité

Consulter la notice pour plus de détails



 **Cepheid**[®]
A better way.

Stratégie de contrôle du test de Cepheid

- **Chaque cartouche Xpert est un dispositif de test clos.**
 - **Cepheid a conçu des méthodes moléculaires spécifiques de façon à inclure des contrôles internes permettant au système de détecter des modes d'échec spécifiques au sein de chaque cartouche.**
 - **Contrôle du système de l'instrument : Contrôle de l'état**
 - **Contrôle des réactifs : Probe Check (Vérification de la sonde)**
 - **Contrôle du traitement de l'échantillon : Contrôle du traitement de l'échantillon et/ou CAE**
 - **Contrôle de l'amplification : Contrôle du traitement de l'échantillon et/ou CAE et ou contrôle interne**

Contrôle du système de l'instrument – contrôle de l'état

- **Le contrôle du système d'instrument vérifie les composants optiques, la température du module et l'intégrité mécanique de chaque cartouche.**
 - **Si les contrôles du système échouent, un résultat de test ERREUR sera indiqué.**

Contrôle des réactifs – contrôle de vérification de la sonde

- **Après la préparation de l'échantillon, la reconstitution des billes, le remplissage des tubes réactionnels (avant les cycles thermiques), plusieurs mesures de fluorescence sont effectuées à différentes températures.**
- **Les mesures sont comparées aux valeurs par défaut, établies par Cepheid.**
- **Les contrôles de vérification de la sonde détectent :**
 - **Absence du réactif spécifique de la cible et/ou des billes de réactif enzymatique, qui contiennent toutes les amorces, les sondes et les matrices de contrôle interne**
 - **Reconstitution incomplète des réactifs**
 - **Remplissage incomplet des tubes réactionnels**
 - **Dégradation des sondes**
- **Si la vérification de la sonde échoue, un résultat de test ERREUR sera indiqué.**

Contrôle de traitement de l'échantillon - CTE

- Le contrôle de traitement de l'échantillon (CTE) vérifie l'efficacité des étapes de préparation de l'échantillon, notamment le remplissage du tube réactionnel.
- Le CTE contient des spores de *Bacillus globigii*.
- Le CTE vérifie :
 - Absence d'amorce/sonde ou de billes d'enzyme
 - Reconstitution incomplète des réactifs
 - Remplissage incomplet des tubes réactionnels
 - Dégradation de l'enzyme
 - Lyse de l'échantillon, extraction de l'acide nucléique et intégrité de l'acide nucléique
 - Inhibition de l'échantillon
- Le CTE peut être négatif ou positif dans un échantillon positif pour l'analyte.
- En cas d'échec du CTE dans un échantillon négatif pour l'analyte, le résultat du test rapporté sera **NON VALIDE**.

Contrôles externes disponibles sur le marché

Nom de l'organisme	Bêta-lactamases présentes	Source
<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

- **Autres options :**
 - Échantillons patients positifs et négatifs connus

Analyse des résultats

Consulter la notice pour plus de détails

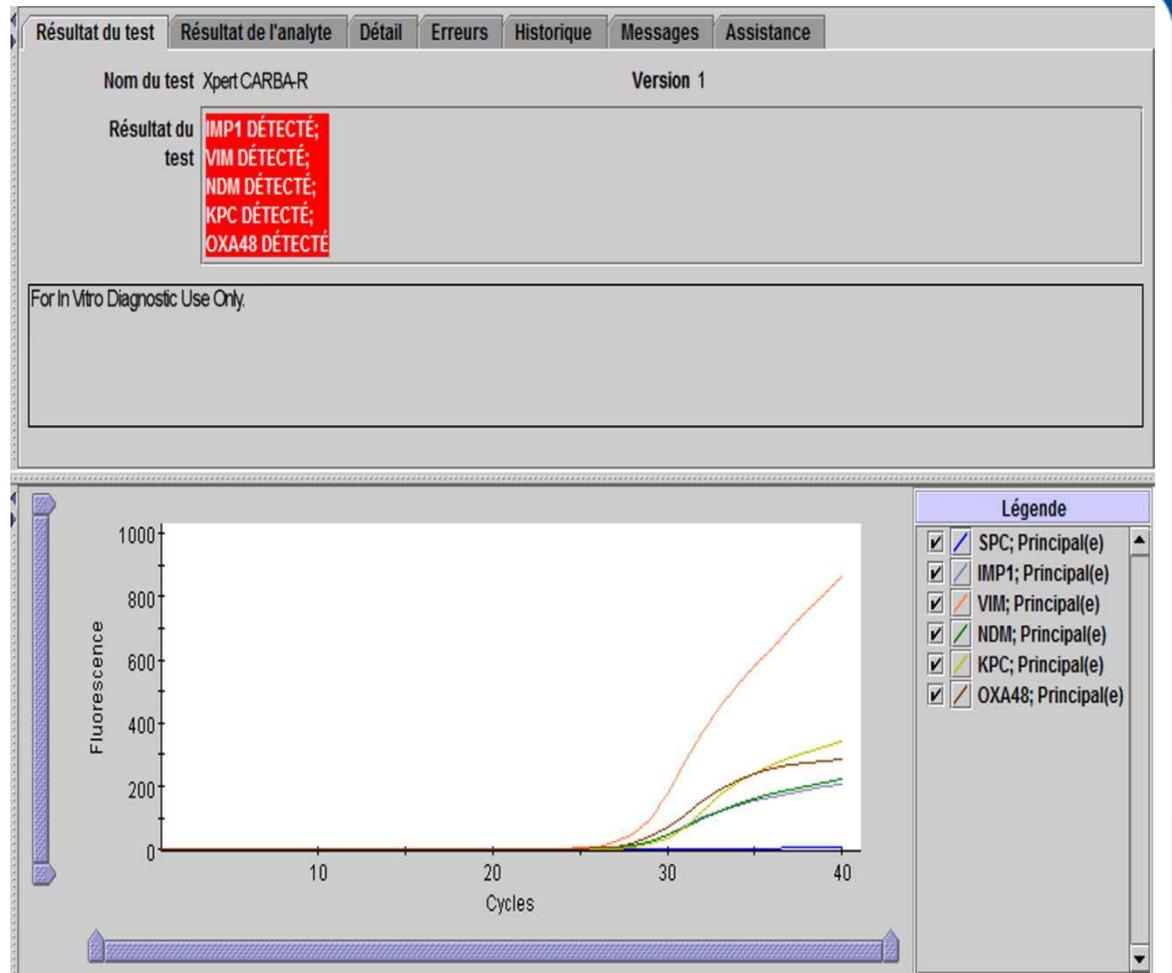


 **Cepheid**[®]
A better way.

Résultats du test Xpert Carba-R :

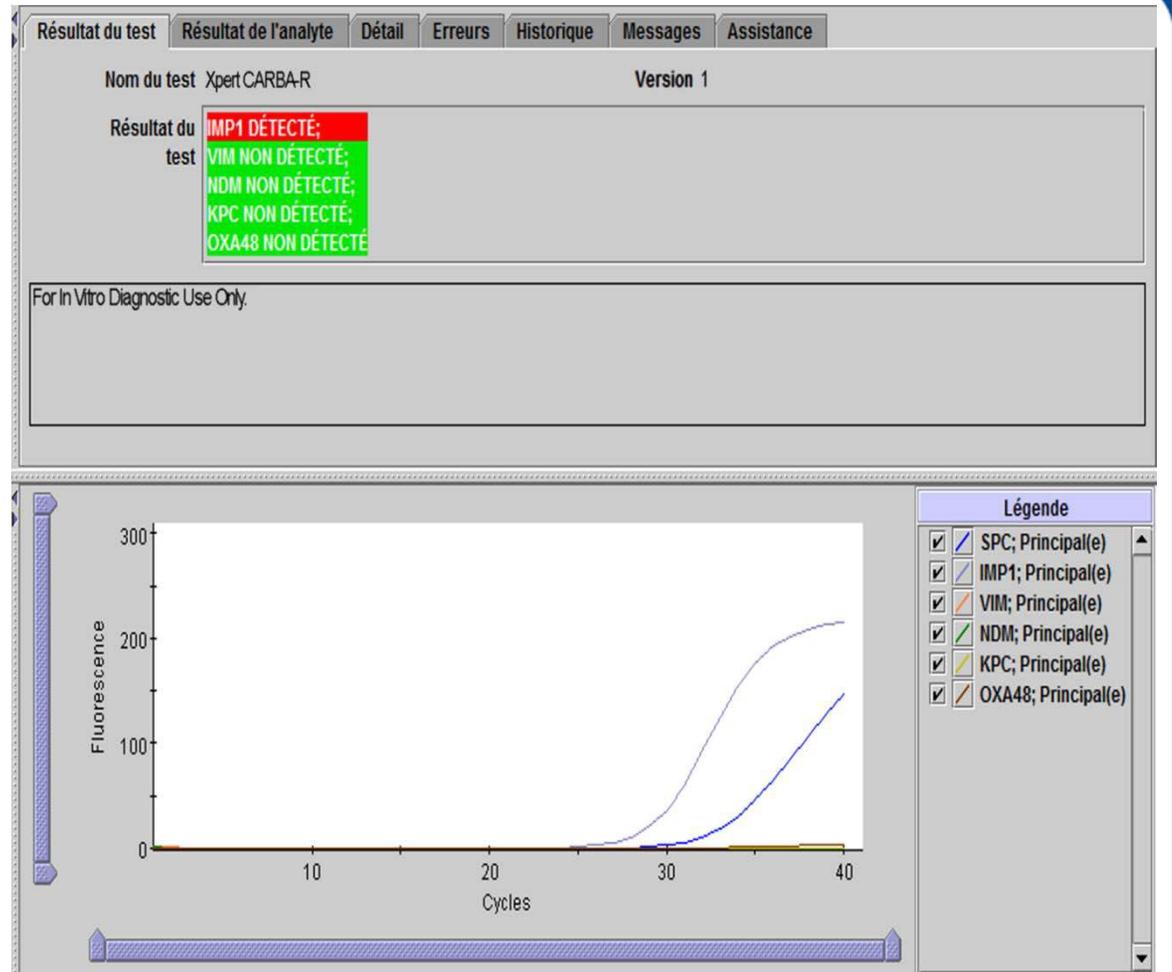
MP1 Pos/ VIM Pos/ NDM Pos/ KPC Pos/ OXA48 Pos

- Les séquences des ADN cibles IMP1, VIM, NDM, KPC et OXA48 sont détectées.
- CTE : non applicable (N/A). Le CTE est ignoré car l'amplification des ADN cibles IMP1, VIM, NDM, KPC et OXA48 peut entrer en compétition avec ce contrôle.
- Vérification de la sonde : RÉUSSIE. Tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultats du test Xpert Carba-R : IMP1 Pos/ VIM Nég/ NDM Nég/ KPC Nég/ OXA48 Nég

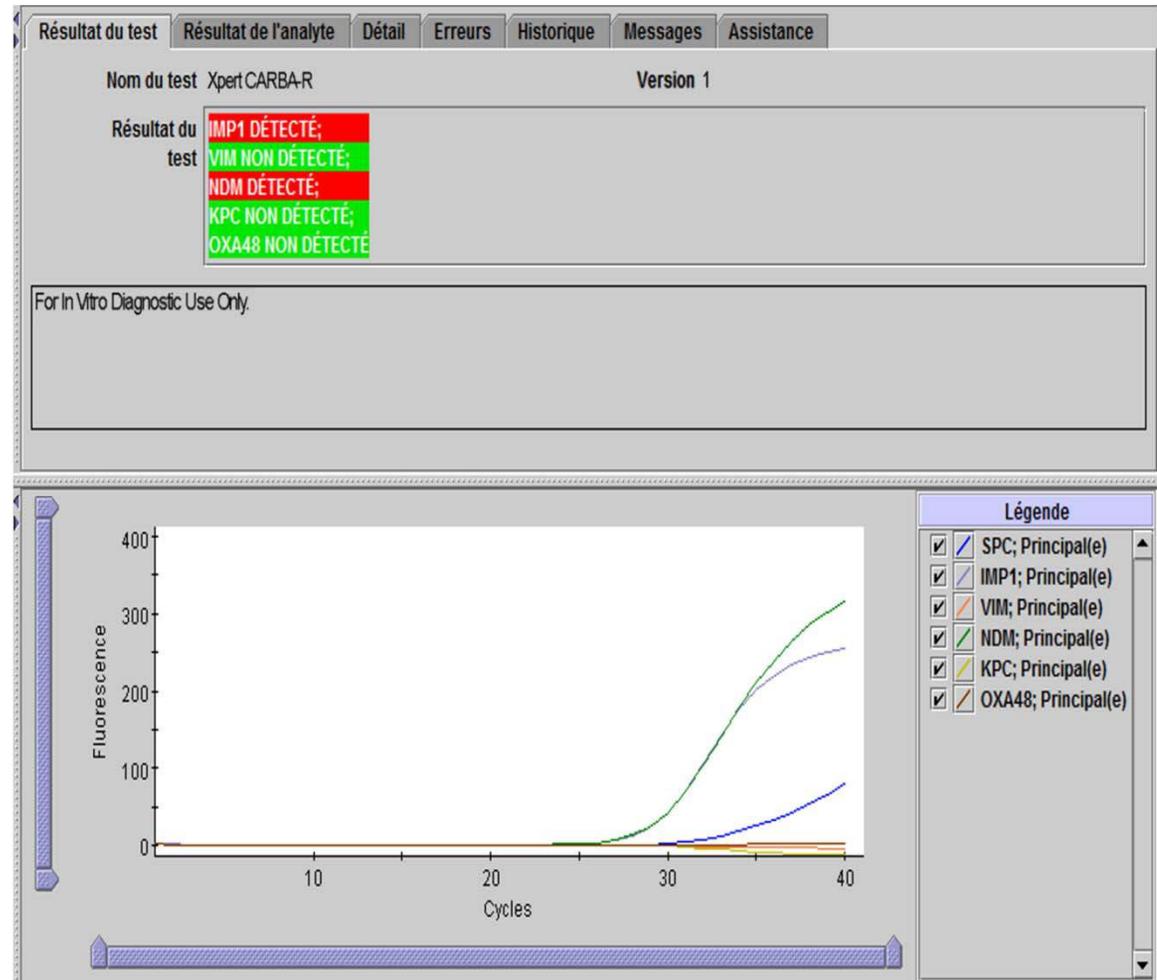
- La séquence d'ADN cible IMP1 est détectée ; les séquences des ADN cibles VIM, NDM, KPC et OXA48 ne sont pas détectées.
- CTE : non applicable (N/A). Le CTE est ignoré car l'amplification de l'ADN cible IMP1 peut entrer en compétition avec ce contrôle.
- Vérification de la sonde : RÉUSSIE. Tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultats du test Xpert Carba-R :

IMP1 Pos/ VIM Nég/ NDM Pos/ KPC Nég/ OXA48 Nég

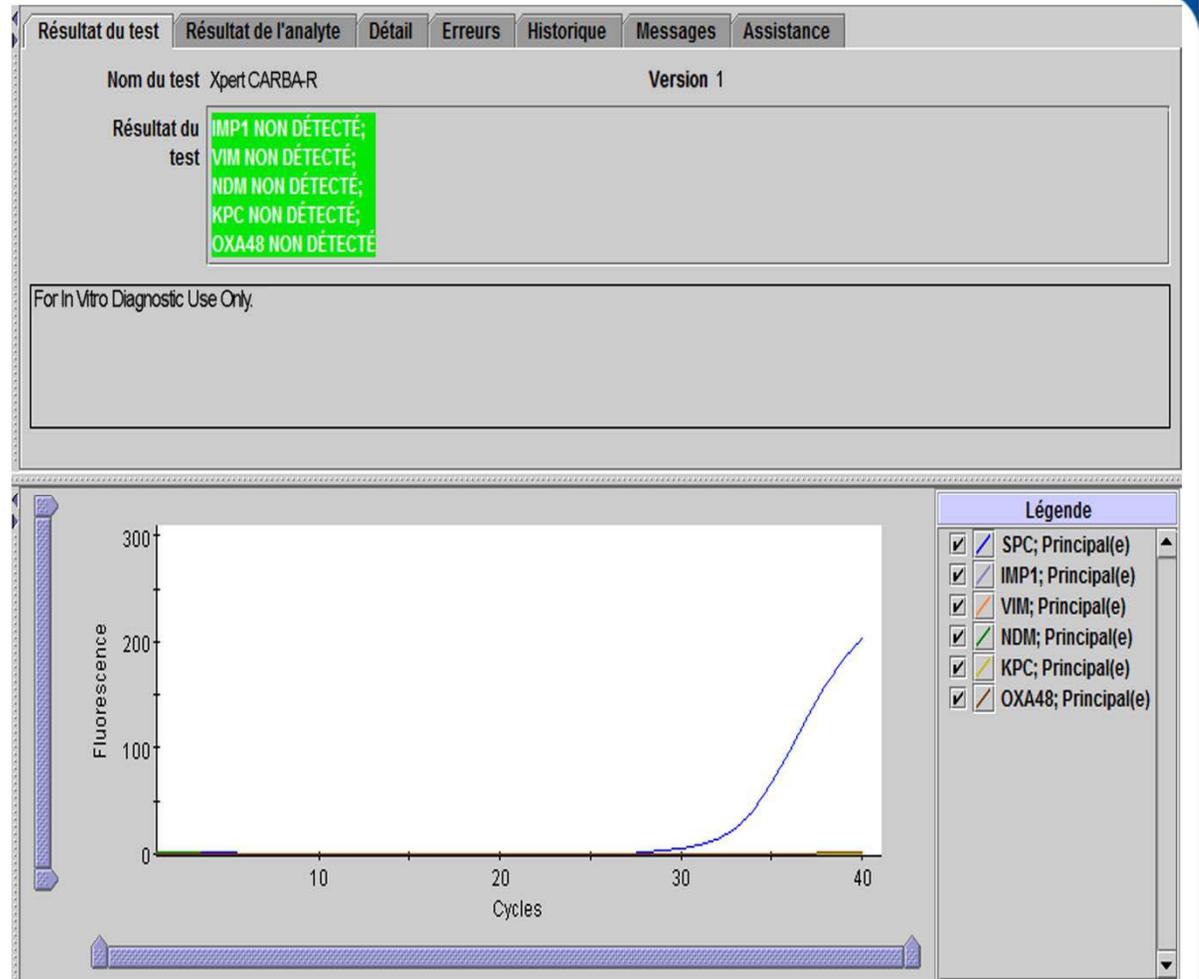
- Les séquences des ADN cibles IMP1 et NDM sont détectées ; les séquences des ADN cibles VIM, KPC et OXA48 ne sont pas détectées.
- CTE : non applicable (N/A). Le CTE est ignoré car l'amplification des ADN cibles IMP1 et NDM peut entrer en compétition avec ce contrôle.
- Vérification de la sonde : RÉUSSIE. Tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultats du test Xpert Carba-R :

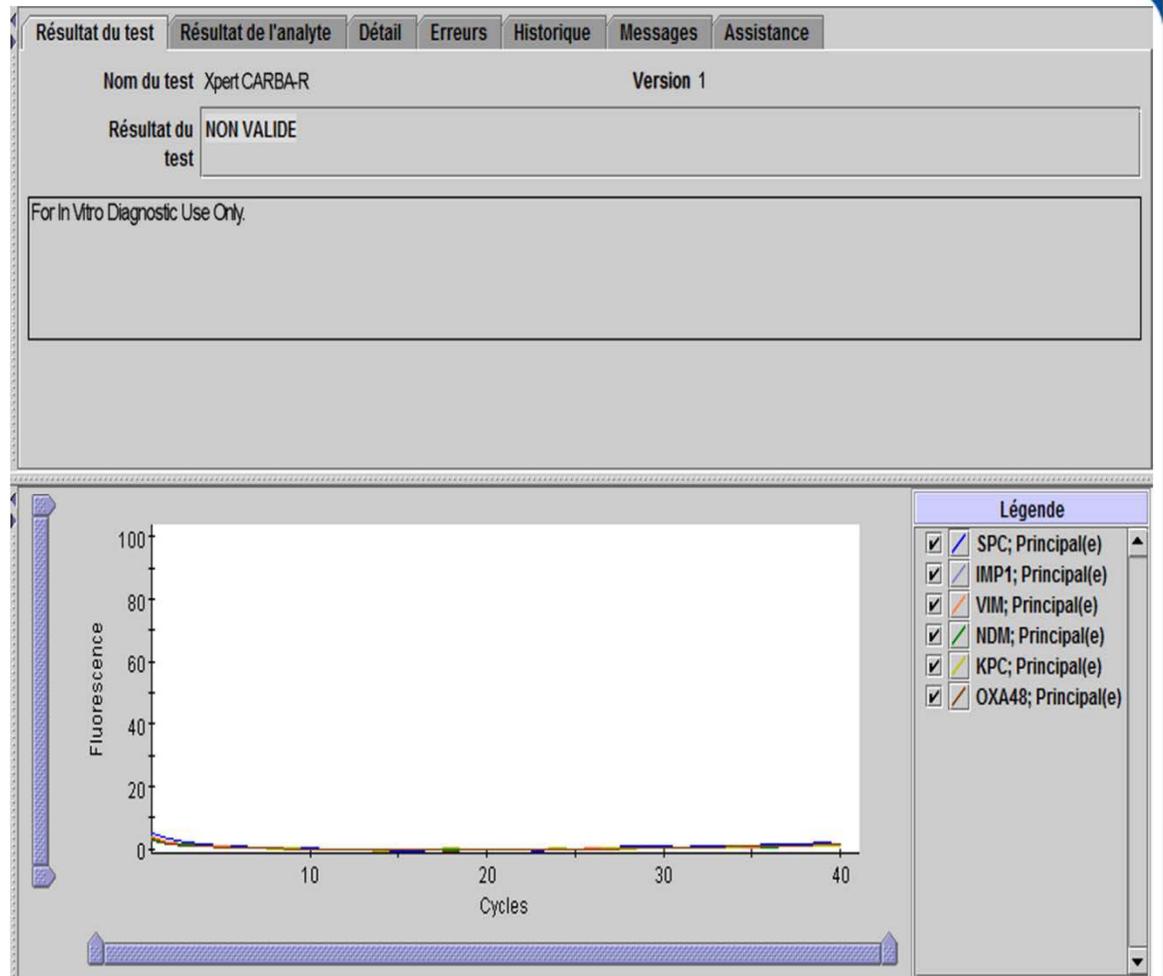
IMP1 Nég/ VIM Nég/ NDM Nég/ KPC Nég/ OXA48 Nég

- Les séquences des ADN cibles IMP1, VIM, NDM, KPC et OXA48 ne sont pas détectées.
- CTE : RÉUSSITE ; la valeur Ct obtenue par amplification PCR de la séquence d'ADN du CTE est comprise dans la plage valide et le niveau de fluorescence est supérieur au seuil minimal défini.
- Vérification de la sonde : RÉUSSIE. Tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



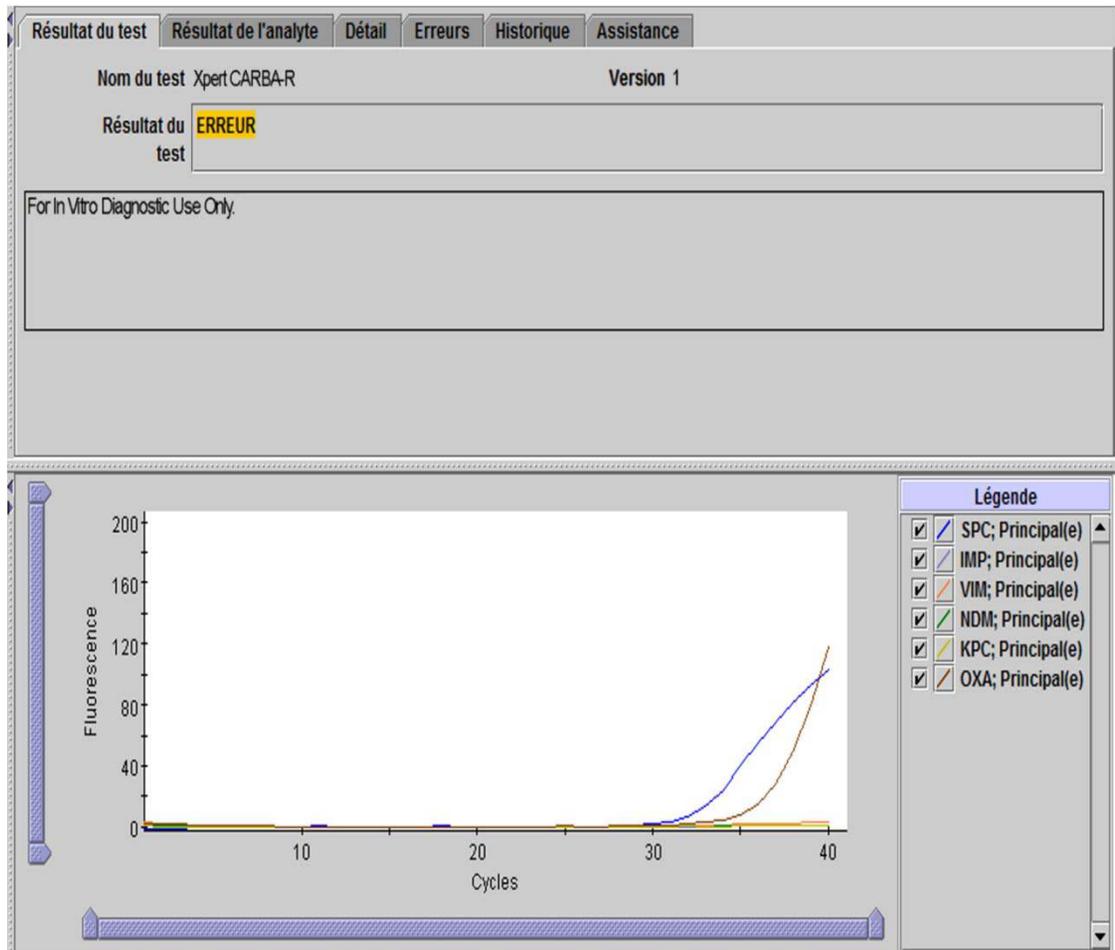
Résultats du test Xpert Carba-R : NON VALIDE

- La présence ou l'absence des séquences des ADN cibles IMP1, VIM, NDM, KPC et OXA48 ne peut pas être déterminée.
- CTE : ÉCHEC ; aucune amplification PCR de la séquence d'ADN du CTE, ou la valeur Ct du CTE n'est pas comprise dans la plage valide, et le niveau de fluorescence est inférieur au seuil minimal défini.
- CVS : RÉUSSITE ; tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultat du test Xpert Carba-R : ERREUR

- La présence ou l'absence des séquences des ADN cibles IMP1, VIM, NDM, KPC et OXA48 ne peut pas être déterminée.
 - CTE : PAS DE RÉSULTAT
 - CVS : ÉCHEC* ; Un ou tous les contrôles de vérification de la sonde n'ont pas réussi. Le CVS n'a probablement pas réussi en raison du remplissage incorrect d'un tube réactionnel ou parce qu'un problème d'intégrité de la sonde a été détecté.
- * Si la vérification de la sonde a réussi, l'erreur est due à une défaillance d'un composant du système.



Résultat du test Xpert Carba-R : PAS DE RÉSULTAT

- Il n'est pas possible de déterminer la présence ou l'absence d'ADN cible de Carba-R. Suivre les consignes de la section 13, **Procédure de répétition du test** de la notice pour répéter le test. Les données recueillies sont insuffisantes pour produire un résultat de test (par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours).
- CTE : PAS DE RÉSULTAT
- CVS : Sans objet

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

- Un résultat **NON VALIDE** indique que le CTE a échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement, ou la PCR a été inhibée.
- Un résultat **ERREUR** indique que le contrôle de vérification de la sonde a échoué et que le test a été annulé, possiblement en raison d'un tube réactionnel mal rempli, de la détection d'un problème d'intégrité de la sonde ou d'un dépassement des limites de pression maximale.
- Un résultat **PAS DE RÉSULTAT** indique que les données recueillies étaient insuffisantes. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours.

Facteurs affectant négativement les résultats

- **Prélèvement incorrect de l'échantillon**
 - Les performances avec d'autres dispositifs de prélèvement et d'autres types d'échantillon n'ont pas été évaluées.
 - Pour les tests contenant le CAE, un échantillon ne contenant pas de cellules humaines entraînera un résultat de test non valide.
- **Transport ou conservation incorrecte de l'échantillon prélevé**
 - Les conditions de conservation et de transport sont spécifiques de l'échantillon.
 - Consulter la notice pour obtenir des consignes de manipulation appropriée.
- **Procédure de test incorrecte**
 - Une modification des procédures de test peut altérer les performances du test.
 - Une erreur technique ou une confusion des échantillons peut avoir un impact sur les résultats du test.
 - Il est nécessaire de bien respecter la notice pour éviter des résultats erronés.
- **Substance interférente**
 - Des résultats de test faussement négatif ou des résultats non valides peuvent être observés en cas de présence d'une substance interférente.
- **Le nombre de microorganismes dans l'échantillon est inférieur à la limite de détection du test**
- **Consulter la notice pour le taux d'indéterminés**

Substances interférentes

- **Parmi les 23 substances potentiellement interférentes testées, le Pepto-Bismol à 0,25 % (m/v) avait un effet inhibiteur statistiquement significatif sur la détection d'IMP-1 dans le test Xpert Carba-R Assay. Aucun autre effet inhibiteur statistiquement significatif n'a été observé.**
- **Consulter la notice du test Xpert Carba-R pour obtenir des informations supplémentaires sur les substances potentiellement interférentes.**

Procédure de répétition du test Carba-R

1	Éliminer la cartouche usagée.	
2	Retirer la nouvelle cartouche Xpert Carba-R, le nouveau flacon de réactif échantillon et la nouvelle pipette de transfert du kit de test.	
3	Transférer le liquide restant du flacon de réactif échantillon d'origine (conservé ≤ 4 jours entre 2 °C et 8 °C) dans le nouveau flacon de réactif échantillon.	
4	Répéter le test en utilisant une cartouche neuve.	
5	Suivre la notice quant à la manière de réaliser un test.	

Débat et questions-réponses



 **Cepheid**[®]
A better way.

Assistance technique

- **Cepheid offre une assistance technique sur place, par téléphone, par fax et par email.**
- **Amérique du Nord :**
 - **Téléphone : +1 (888) 838-3222**
 - **Fax : +1 (408) 716-2550**
 - **E-mail : techsupport@cepheid.com**
- **Europe, Afrique, Moyen-Orient, Péninsule indienne :**
 - **Téléphone :**
 - France : +33 563 825 319**
 - Allemagne : +49 69 710 480 480**
 - Royaume-Uni : +44 3303 332 533**
 - Afrique du Sud : +27 11 234 9636**
 - Australie, Nouvelle Zélande : +61 1800 107 884**
 - Autres pays d'Europe, du Moyen-Orient et d'Afrique : +971 4 253 3218**
 - **Fax : +33 563 825 301**
 - **E-mail : support@cepheideurope.com**

Débat et questions-réponses

