

Formazione sul saggio: Xpert[®] Carba-R

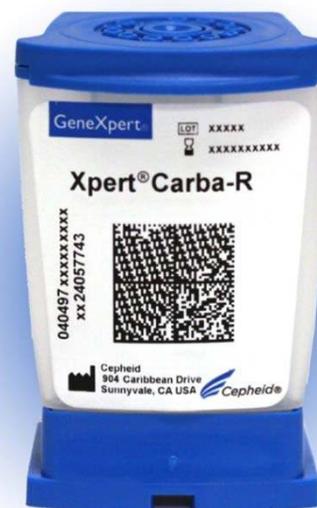
Assistenza Tecnica di Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid**[®]
A better way.

Scaletta del programma di formazione

- **Formazione Xpert Carba-R**
 - Reagenti
 - Raccolta del campione
 - Conservazione e manipolazione del kit
 - Precauzioni
 - Preparazione della cartuccia
- **Controllo qualità**
- **Analisi dei risultati**
- **Discussione, domande e risposte**



Obiettivi della formazione Xpert Carba-R

Al termine della formazione, l'operatore sarà in grado di:

- **conservare e manipolare correttamente i kit di cartucce Xpert Carba-R**
- **seguire le corrette precauzioni di sicurezza del laboratorio**
- **raccogliere il campione di analisi del tipo giusto e trasportarlo**
- **predisporre la cartuccia ed eseguire il saggio**
- **refertare i vari risultati generati dal software**
- **capire la strategia di controllo del saggio.**

Introduzione riguardante lo stato della malattia

Che cos'è la resistenza ai carbapenemi (Carba-R)?

- I carbapenemi sono un tipo di antibiotici beta-lattamici spesso usati come antibiotico di ultima linea.
 - La resistenza ai carbapenemi (Carba-R) deriva da geni di resistenza cromosomici, altamente mobili e plasmide-mediati, associati agli organismi enterici Gram-negativi, allo *Pseudomonas* e agli acinetobatteri.
 - Le infezioni con organismi non suscettibili ai carbapenemi sono correlate ad alti tassi di mortalità (fino al 40-50%).¹
 - Lo screening dei pazienti colonizzati può accelerare le pratiche di controllo dell'infezione e ridurre la probabilità di diffusione nel nosocomio.



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 soluzione Cepheid



- **Rilevamento e differenziazione simultanei**
 - Cinque target di geni Carba-R
 - Due controlli interni per ogni singolo campione
 - Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)
 - Controllo per la verifica della sonda (PCC)
- **Sensibilità e specificità elevate**
- **Semplice e facile da utilizzare**
 - Sistema con cartuccia chiusa
- **Risultati in 48 minuti**
- **Risultati su richiesta 24 ore al giorno, 7 giorni su 7**
- **Accesso casuale**

Uso previsto

Il saggio Cepheid Xpert Carba-R Assay, eseguito sui sistemi degli strumenti GeneXpert®, è un test diagnostico qualitativo *in vitro* studiato per individuare e differenziare rapidamente le sequenze geniche bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} e bla_{IMP-1} associate alla non suscettibilità ai carbapenemi nei batteri Gram-negativi ottenuti da campioni di analisi di tamponi rettali in pazienti a rischio di colonizzazione intestinale da parte di batteri non suscettibili ai carbapenemi. Il test si avvale della reazione a catena della polimerasi (PCR) automatizzata in tempo reale. Il saggio Xpert Carba-R Assay è indicato come ausilio nell'identificazione dei batteri non suscettibili ai carbapenemi che colonizzano i pazienti negli ambienti sanitari. Il saggio Xpert Carba-R Assay non è destinato all'uso come guida o monitoraggio per il trattamento delle infezioni da batteri non suscettibili ai carbapenemi.

Per ottenere gli organismi da utilizzare per la tipizzazione epidemiologica, l'analisi della suscettibilità antimicrobica e l'ulteriore identificazione a conferma dei batteri non suscettibili ai carbapenemi sono necessarie colture complementari.

Requisiti dei sistemi e dei reagenti

Sistemi GeneXpert

- **Moduli a sei colori**
- **Software GX DX v4.3 o superiore**

Kit di analisi (CE-IVD)

- **GXCARBAR-CE-10**

Kit di raccolta campioni

- **Numero di catalogo Cepheid 900-0370**

Kit Xpert Carba-R

	Xpert Carba-R Assay
N. di catalogo	GXCARBAR-CE-10
Test eseguibili con ciascun kit	10
Contenuto della cartuccia per il test	Reagenti secchi e liquidi
Pipetta di trasferimento	10
Flaconcini dei reagenti per i campioni	10
Conservazione	2 °C - 28 °C



Raccolta, trasporto e conservazione del campione Xpert Carba-R



Dispositivo di prelievo campioni Cepheid
(n. parte 900-0370)

- **Tipo di campione:**
 - **Raccolta del tampone rettale.**
- **Raccolta del campione:**
 - **Prelevare una coppia di tamponi rettali inserendo con cura le punte di entrambi i tamponi per circa 1 cm oltre lo sfintere anale e facendole ruotare delicatamente.**
- **Trasporto e conservazione del campione:**
 - **Subito dopo la raccolta, è possibile tenere il campione del tampone a temperature comprese fra 15 °C e 28 ° C per un massimo di 6 ore. Dopodiché, può essere conservato a temperature fra 2 ° C e 28 ° C per 7 giorni.**

Raccolta del campione

Protocollo di raccolta dei campioni rettali

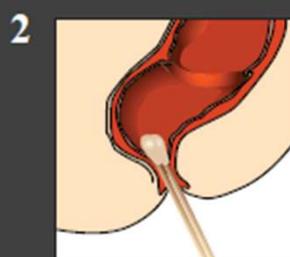
GeneXpert®

Per l'uso con i saggi Xpert®:

- Xpert Carba-R



Per prelevare il campione di analisi occorre utilizzare un tampone doppio Copan Venturi Transystem. Dispositivo di prelievo Cepheid n. 900-0370



Inserire con attenzione le punte di entrambi i tamponi approssimativamente 1 cm oltre lo sfintere anale e farli ruotare delicatamente.



Reinserire i tamponi nella provetta.



È possibile conservare a temperature comprese fra 15 °C e 28 °C i campioni di analisi che possono essere analizzati entro 6 ore. I campioni di analisi conservati tra 2 °C e 28 °C sono stabili per un massimo di 7 giorni.

La definizione di diagnostica molecolare *su richiesta*

 **Cepheid.**
Bring answers to life.

301-3343 Rev A, giugno 2014

 **Cepheid.**

Buone prassi di laboratorio

Approntamento del laboratorio per la PCR

- Preparazione di cartucce e reagenti → Aggiunta del campione → Rilevamento

Conservazione di campioni di analisi e reagenti

- Conservare i campioni di analisi separatamente rispetto ai reagenti per prevenire la contaminazione di questi ultimi.

Apparecchiatura

- Usare puntali per pipette filtrati, quando necessario, per diluizioni di controllo qualità.
- Seguire i consigli del produttore in merito a calibrazione e manutenzione dell'apparecchiatura di laboratorio.

Buona prassi di laboratorio – Segue

Pulizia

- Pulire le superfici di lavoro con candeggina per uso domestico diluita in concentrazione finale di 1:10, seguita da una soluzione di etanolo al 70% o isopropanolo al 70%. Asciugare le superfici di lavoro passandoci sopra un panno.
- In caso di contaminazione, pulire a fondo l'area contaminata con candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10, DNA AWAY o perossido di idrogeno al 3% (p/v) e sciacquare bene con acqua. Asciugare le superfici di lavoro passandoci sopra un panno.

Personale

- Indossare i guanti e il camice da laboratorio.
- Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento.

Area del banco di laboratorio

- Pulire regolarmente l'area del banco di laboratorio.
- Tenere priva di polvere la parte posteriore degli strumenti.

Conservazione e manipolazione del kit Xpert Carba-R



- Conservare i kit di test a temperature comprese fra 2 °C e 28 °C. Non utilizzare cartucce scadute.
- Ciascuna cartuccia monouso serve per l'esecuzione di un test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Aprire la cartuccia solo quando si è pronti per aggiungervi il campione eluito dal tampone.
 - La cartuccia deve essere collocata sullo strumento entro 30 minuti dopo l'aggiunta del campione al suo interno.
- Evitare la contaminazione crociata durante la manipolazione dei campioni.
 - Cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro durante il trattamento.
 - Cambiarsi i guanti prima di lasciare l'area di lavoro e quando vi si entra.
- Non utilizzare una cartuccia che è caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.
- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione sia danneggiata.

Preparazione della cartuccia Xpert Carba-R

Preparazione delle cartucce Xpert® - Carba-R

Per istruzioni dettagliate, avvertenze e precauzioni fare riferimento al foglietto illustrativo.

Per una copia del foglio con i dati di sicurezza, vedere www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com

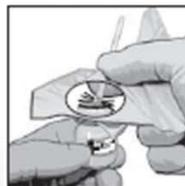
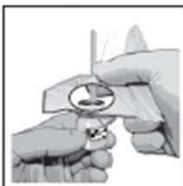
Assistenza Tecnica di Cepheid

Ufficio USA
(888) 838-3222
techsupport@cepheid.com

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



- 1 Per ogni campione procurarsi una cartuccia Xpert e un flaconcino di reagente per campioni.
- 2 Inserire il tampone nel flaconcino del reagente per campioni.
- 3 Spezzare il tampone in corrispondenza della tacca posta accanto all'apertura del flaconcino.
- 4 Chiudere il flaconcino del reagente per campioni e miscelare con il vortex per 10 secondi.
- 5 Aprire il coperchio della cartuccia Xpert.
- 6 Aspirare il reagente per il campione fino al contrassegno sulla pipetta fornita.
- 7 Svotare la pipetta nella camera della cartuccia.
- 8 Chiudere il coperchio della cartuccia Xpert.
- 9 Iniziare il test entro l'intervallo di tempo specificato nel foglietto illustrativo.



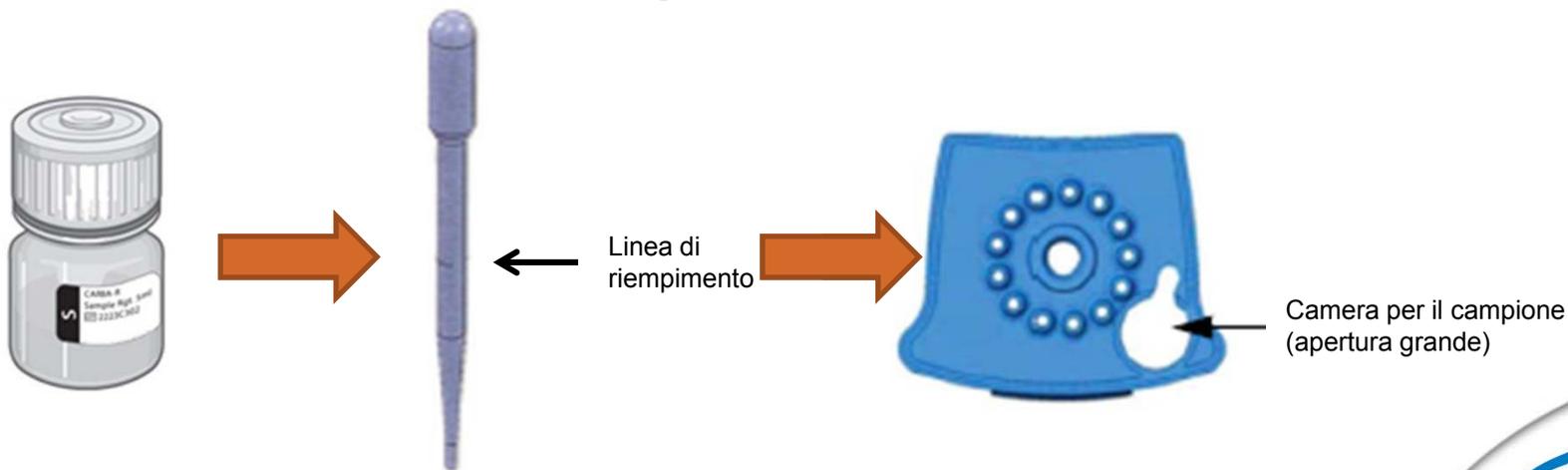
Nota - Non tenere il tampone al di sotto della tacca. Utilizzare una garza o un materiale simile per ridurre al minimo il rischio di contaminazione.

© 2014 Cepheid

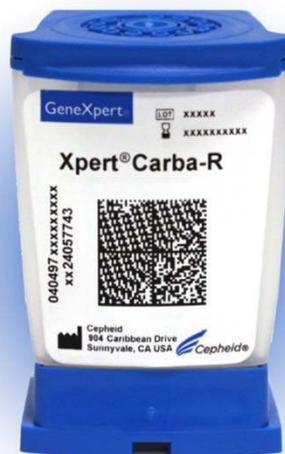
301-33421 Rev. A luglio 2014

Esecuzione del test

- Collocare un singolo tampone nel flaconcino di reagente per il campione; rompere il tampone in corrispondenza della tacca usando una garza sterile per ridurre al minimo i rischi di contaminazione.
 - Mettere il tampone non utilizzato nella provetta di trasporto e conservare a temperature fra 2 °C e 28 °C.
- Miscelare il flaconcino di reagente per il campione su vortex ad alta velocità per 10 secondi.
- Aprire il flaconcino di reagente per il campione.
- Riempire la pipetta di trasferimento fino al contrassegno sulla pipetta.
 - Evitare la formazione di bolle d'aria.
 - Il campione residuo contenuto nel flaconcino di reagente per il campione può essere conservato tra 2 °C e 28 °C fino a 4 giorni nel caso fosse necessario ripetere il test.



Esecuzione del test



Controllo qualità

Per maggiori dettagli, consultare il foglietto illustrativo



 **Cepheid**[®]
A better way.

Strategia di controllo del saggio Cepheid

- **Ciascuna cartuccia Xpert è un dispositivo di test autonomo.**
 - **Cepheid ha ideato appositi metodi molecolari con controlli interni che permettono al sistema di rilevare specifiche modalità di errore in ciascuna cartuccia.**
 - **Controllo del sistema dello strumento: Verifica stato**
 - **Controllo del reagente: Controllo sonda**
 - **Controllo per il trattamento dei campioni: SPC e/o SAC**
 - **Controllo dell'amplificazione: SPC e/o SAC e/o IC**

Controllo del sistema dello strumento – Verifica stato

- **Il controllo del sistema dello strumento verifica i sistemi ottici, la temperatura del modulo e l'integrità meccanica di ciascuna cartuccia.**
 - **Se i controlli del sistema non vengono superati, il sistema segnalerà un risultato ERRORE.**

Controllo del reagente – Controllo per la verifica della sonda

- Dopo la preparazione del campione, la ricostituzione della microsfera e il riempimento della provetta (prima dell'esecuzione dei cicli termici), vengono misurati svariati valori di fluorescenza a temperature differenti.
- I valori rilevati vengono confrontati con le impostazioni predefinite stabilite da Cepheid.
- La verifica della sonda serve a individuare:
 - **Microsfere mancanti di reagente specifico per la sequenza bersaglio (Target Specific Reagent, TSR) e/o di reagente enzimatico, che contengono tutti i primer, le sonde e il template del controllo interno**
 - **Ricostituzione incompleta del reagente**
 - **Riempimento incompleto della provetta di reazione**
 - **Degrado della sonda**
- **Se la verifica della sonda non viene superata, il sistema segnalerà un risultato ERRORE.**

Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)

- Il controllo per il trattamento dei campioni (SPC) valuta l'efficacia delle fasi di preparazione del campione, incluso il riempimento della provetta di reazione.
- L'SPC è costituito da spore di *Bacillus globigii*.
- L'SPC serve a individuare:
 - Primer/sonda o microsferi enzimatiche mancanti
 - Ricostituzione incompleta del reagente
 - Riempimento incompleto della provetta di reazione
 - Degrado dell'enzima
 - Lisi del campione, estrazione dell'acido nucleico e integrità dell'acido nucleico
 - Inibizione del campione
- L'SPC può essere negativo o positivo in un campione analita-positivo.
- Se l'SPC non dà i risultati previsti in un campione analita-negativo, il sistema segnalerà un risultato NON VALIDO.

Controlli esterni disponibili in commercio

Nome organismo	Beta-lattamasi presenti	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

- **Altre opzioni:**
 - **Campioni di pazienti noti come positivi e negativi**

Analisi dei risultati

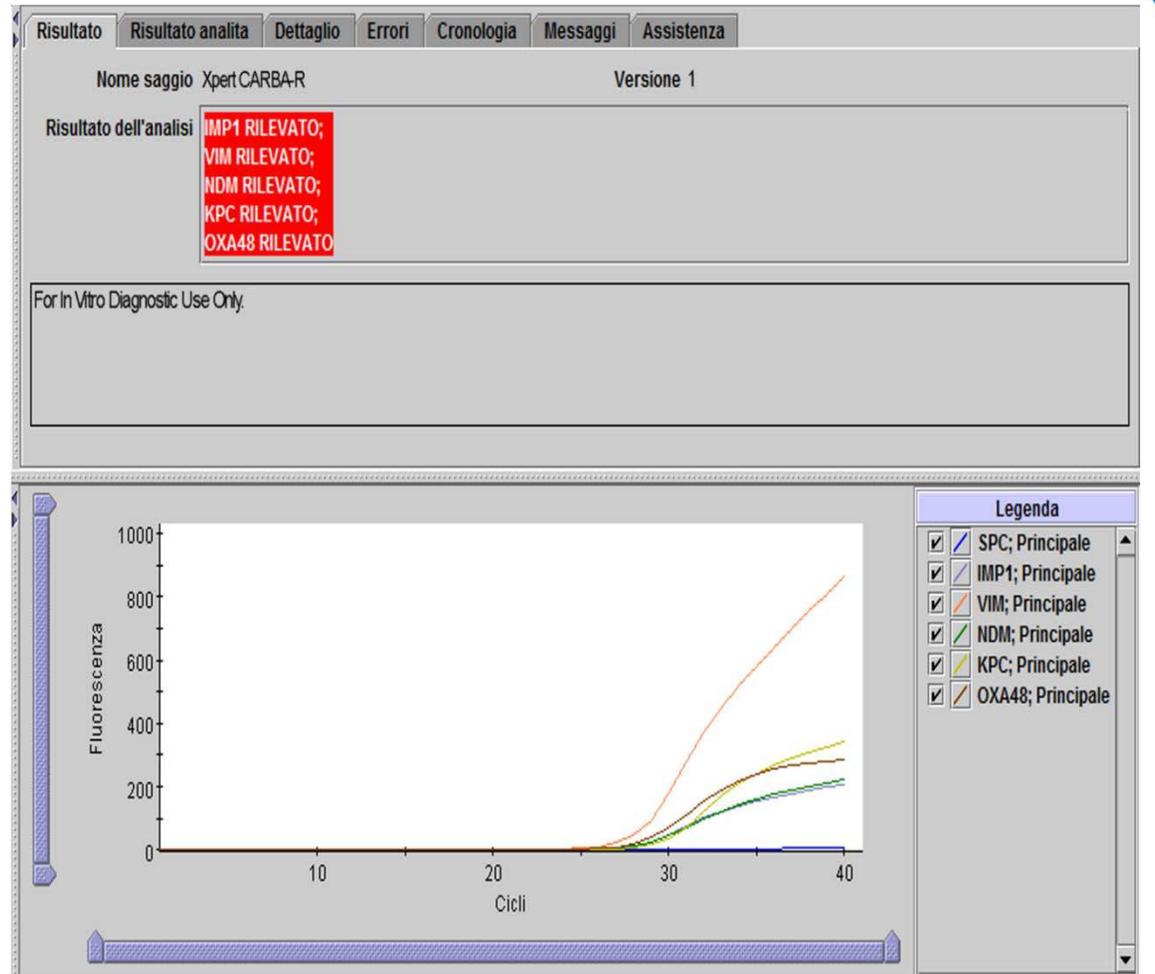
Per maggiori dettagli, consultare il foglietto illustrativo



 **Cepheid**[®]
A better way.

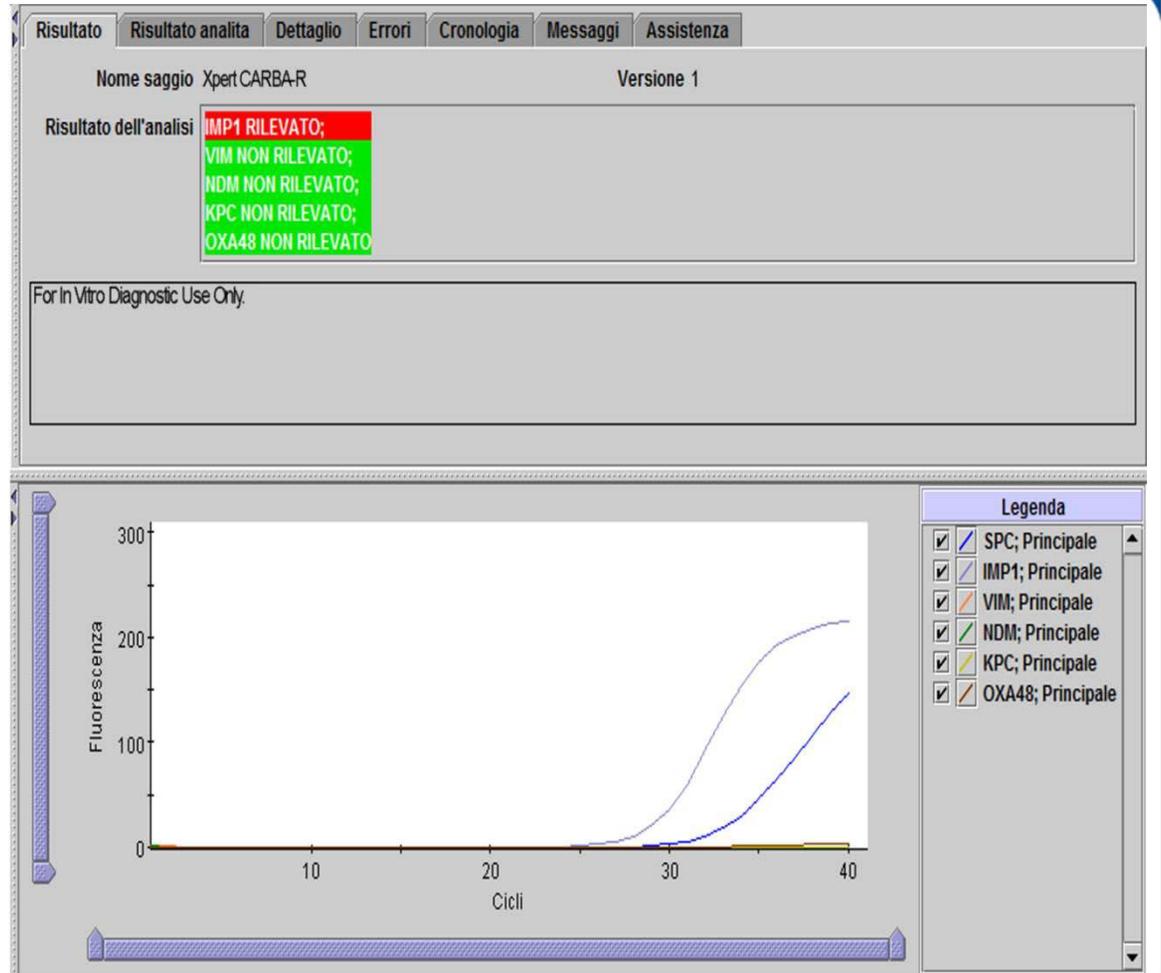
Risultati Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Pos/ NDM Pos/ KPC Pos/ OXA48 Pos

- Sono state rilevate le sequenze bersaglio del DNA di IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48.
- SPC: Non applicabile (N/A). L'SPC viene ignorato perché le amplificazioni del DNA bersaglio di IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48 possono competere con questo controllo.
- Verifica della sonda: **AMMESSO**. Tutti i risultati del controllo sonda sono riusciti.



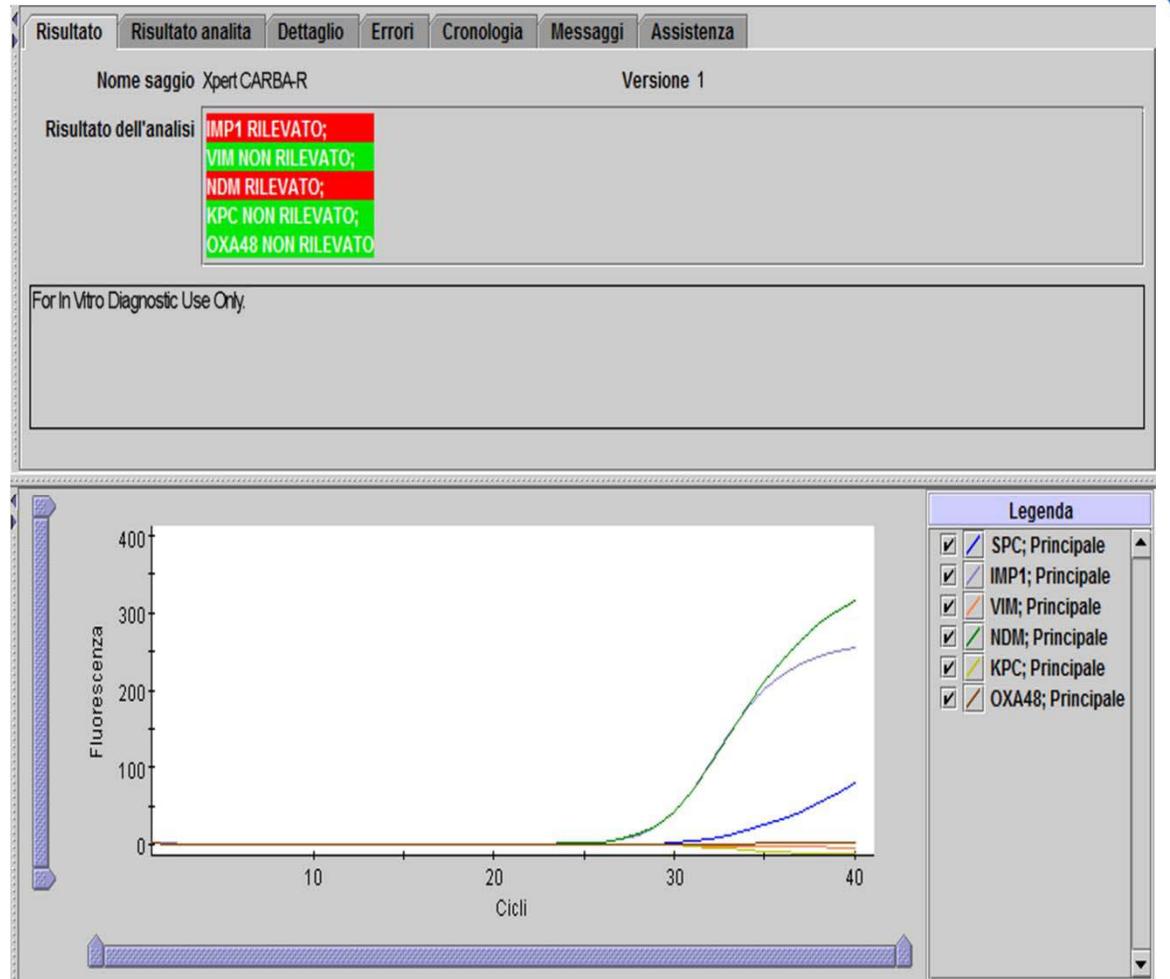
Risultati Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- È stata rilevata la sequenza bersaglio del DNA di IMP1; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, NDM, KPC e OXA48 non sono state rilevate.
- SPC: Non applicabile (N/A). L'SPC viene ignorato perché l'amplificazione del DNA bersaglio di IMP1 può competere con questo controllo.
- Verifica della sonda: **AMMESSO**. Tutti i risultati del controllo sonda sono riusciti.



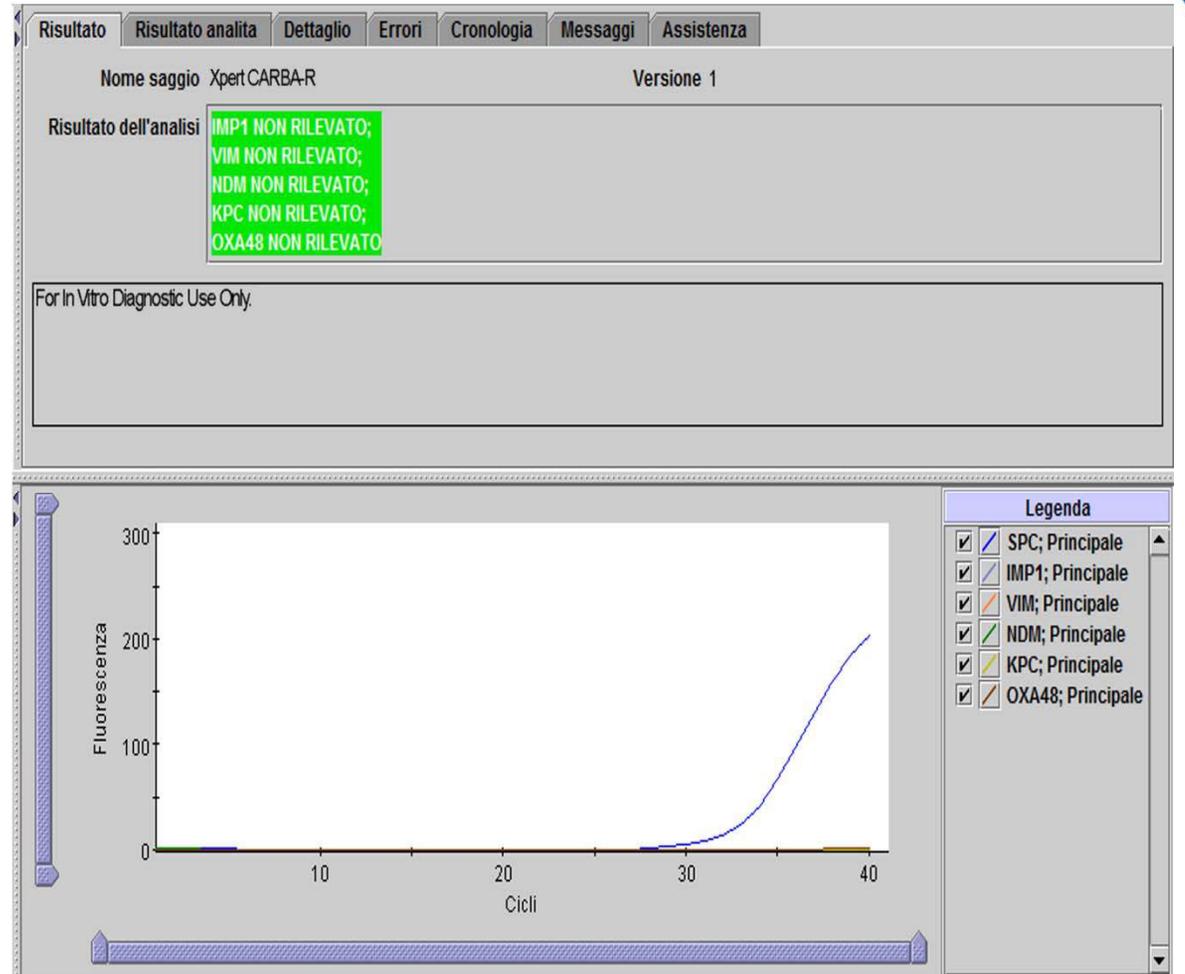
Risultati Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Pos/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Sono state rilevate le sequenze bersaglio del DNA di IMP1 e NDM; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, KPC e OXA48 non sono state rilevate.
- SPC: Non applicabile (N/A). L'SPC viene ignorato perché l'amplificazione del DNA bersaglio di IMP1 e NDM può competere con questo controllo.
- Verifica della sonda: **AMMESSO**. Tutti i risultati del controllo sonda sono riusciti.



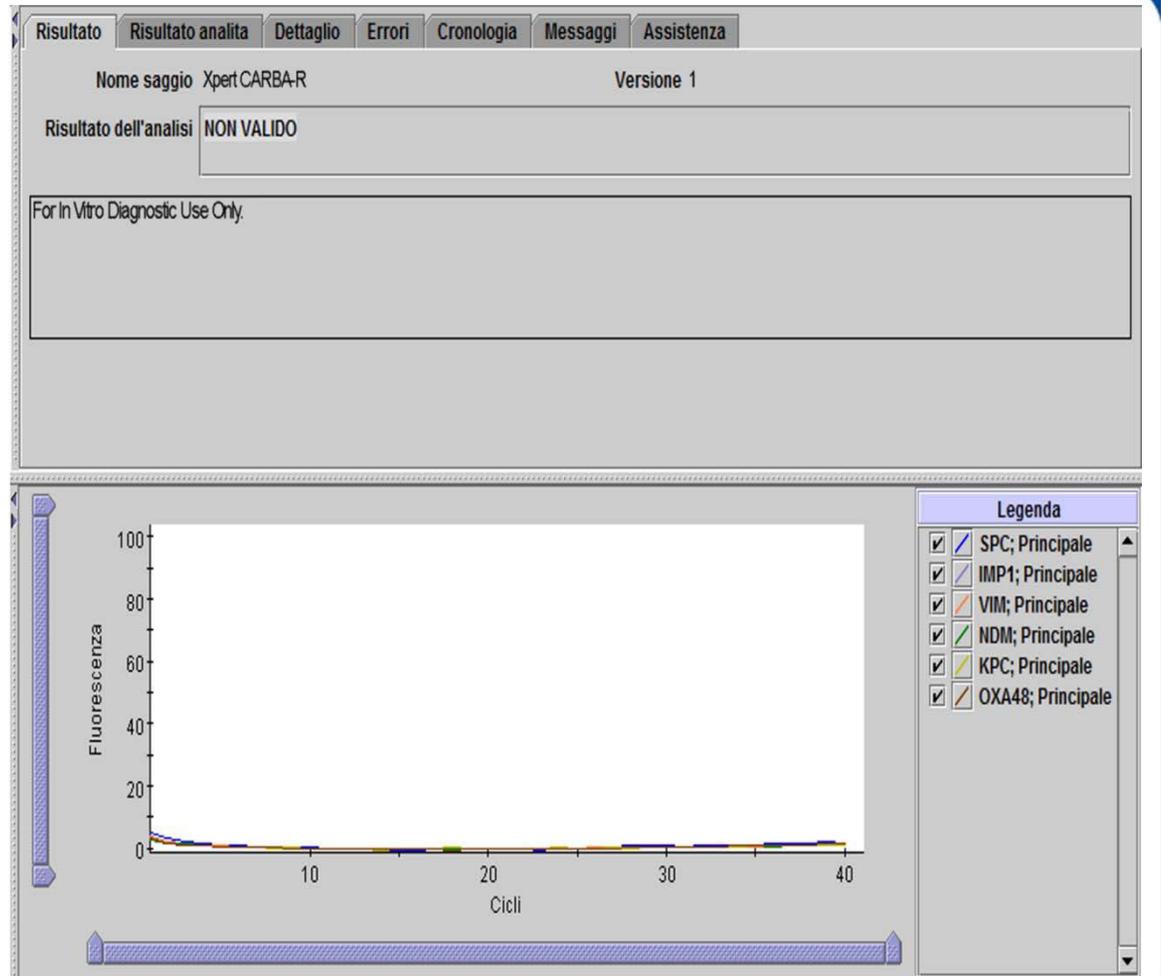
Risultati Xpert Carba-R: IMP1 Neg/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- **Non sono state rilevate le sequenze bersaglio del DNA di IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48.**
- **SPC: AMMESSO.** L'amplificazione mediante PCR della sequenza del DNA dell'SPC fornisce un valore Ct entro l'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra dell'impostazione minima.
- **Verifica della sonda: AMMESSO.** Tutti i risultati del controllo sonda sono riusciti.



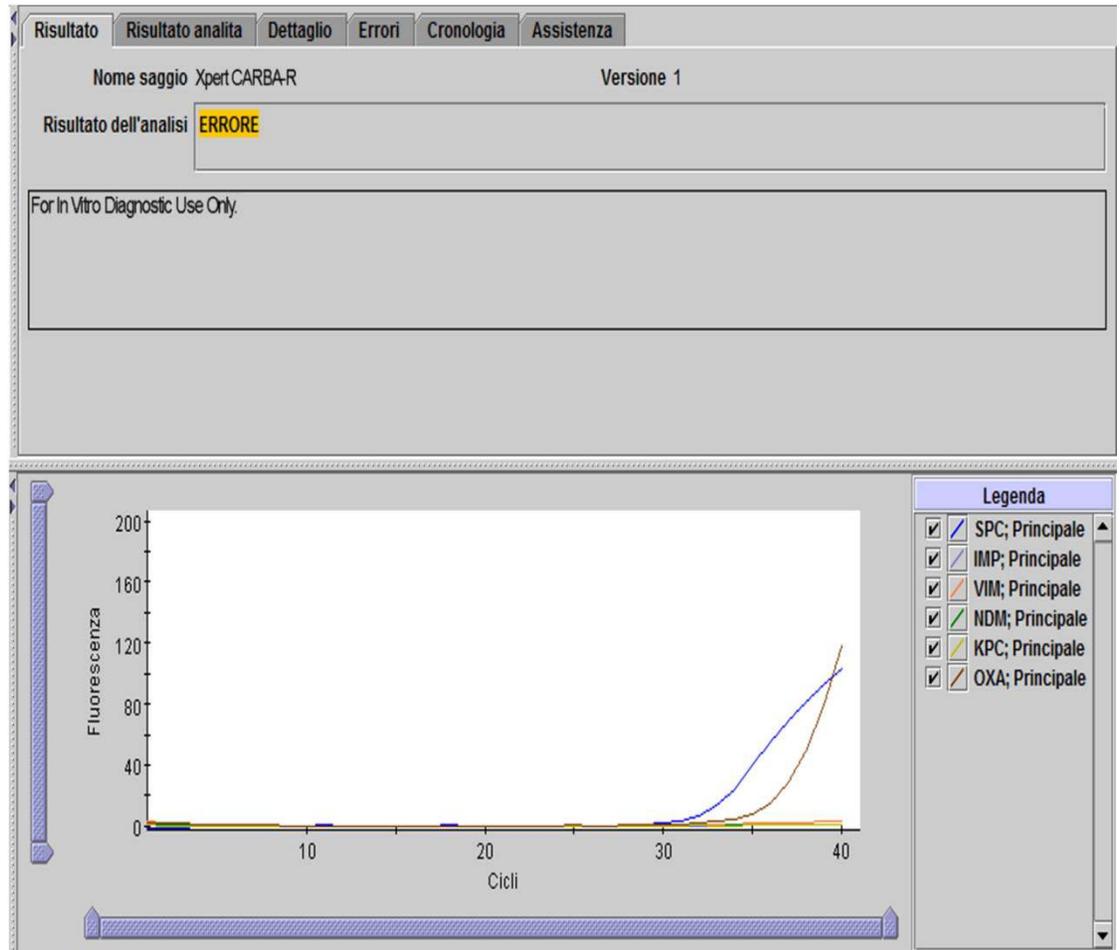
Risultati Xpert Carba-R: NON VALIDI

- **Non è possibile determinare la presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio del DNA di IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48.**
- **SPC: RESPINTO.** Non è stata amplificata nessuna sequenza del DNA dell'SPC, oppure il valore Ct dell'SPC non rientra nell'intervallo di validità e l'endpoint di fluorescenza è al di sotto dell'impostazione minima.
- **PCC: AMMESSO.** Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.



Risultato Xpert Carba-R: ERRORE

- Non è possibile determinare la presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio del DNA di IMP1, VIM, NDM, KPC e OXA48.
 - SPC: NESSUN RISULTATO
 - PCC: RESPINTO*; uno o più risultati della verifica della sonda non sono validi. Il PCC probabilmente non è riuscito perché la provetta di reazione non è stata riempita bene o è stato rilevato un problema di integrità della sonda.
- * Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.



Risultato Xpert Carba-R: NESSUN RISULTATO

- **Non è possibile determinare la presenza o l'assenza del DNA bersaglio del Carba-R. Ripetere il test seguendo le istruzioni indicate nella Sezione 13, [Procedura di ripetizione del test](#) nel foglietto illustrativo. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test (l'operatore, per esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test).**
- **SPC: NESSUN RISULTATO**
- **PCC: Non applicabile**

Motivi per ripetere il saggio

- Un risultato **NON VALIDO** indica che il controllo SPC è stato respinto. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.
- Il risultato **ERRORE** indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.
- **NESSUN RISULTATO** indica che sono stati raccolti dati insufficienti. Per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi mentre era in corso.

Fattori che influiscono negativamente sui risultati

- **Raccolta non corretta del campione di analisi**
 - Non sono state valutate le prestazioni con altri dispositivi di raccolta e altri tipi di campioni di analisi.
 - Per i saggi contenenti il controllo SAC, un campione di analisi che non contiene cellule umane darà un risultato non valido.
- **Trasporto o conservazione non corretti del campione di analisi raccolto**
 - Le condizioni di conservazione e trasporto sono specifiche per i campioni di analisi.
 - Per le istruzioni sulla corretta manipolazione, fare riferimento al foglietto illustrativo.
- **Procedura di analisi non corretta**
 - Apportando modifiche alle procedure di analisi si possono alterare le prestazioni del test.
 - Un errore tecnico o lo scambio dei campioni può influire sui risultati.
 - Per evitare risultati errati, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni descritte nel foglietto illustrativo.
- **Sostanza interferente**
 - In presenza di una sostanza interferente si possono ottenere risultati falsi negativi o risultati non validi.
- **Il numero di organismi contenuti nel campione di analisi è inferiore al limite di rilevamento del test**
- **Per informazioni sul tasso di indeterminati, consultare il foglietto illustrativo**

Sostanze interferenti

- **Delle 23 sostanze potenzialmente inibitrici analizzate, Pepto-Bismol 0,25% p/v ha avuto un effetto inibitore statisticamente significativo sul rilevamento dell'IMP-1 con il saggio Xpert Carba-R Assay. Non sono stati osservati altri effetti inibitori statisticamente significativi.**
- **Per ulteriori dati sulle sostanze potenzialmente interferenti, fare riferimento al foglietto illustrativo Xpert Carba-R.**

Procedura di ripetizione del test Carba-R

1	Gettare la cartuccia usata.	
2	Dal kit di test, estrarre una cartuccia Xpert Carba-R, un flaconcino di reagente per il campione e una pipetta di trasferimento nuovi.	
3	Trasferire il liquido rimasto dal flaconcino di reagente per il campione originale (conservato per ≤ 4 giorni tra 2 °C e 8 °C) al flaconcino del nuovo reagente per il campione.	
4	Ripetere il test con una nuova cartuccia.	
5	Seguire le istruzioni per l'esecuzione del test riportate nel foglietto illustrativo.	

Discussione, domande e risposte



 **Cepheid**[®]
A better way.

Assistenza tecnica

- **Cepheid fornisce assistenza tecnica sul campo, telefonicamente, via fax e per e-mail.**
- **Nord America:**
 - Telefono: +1 (888) 838-3222
 - Fax: +1 (408) 716-2550
 - E-mail: techsupport@cepheid.com
- **Europa, Africa, Medio Oriente, Penisola Indiana:**
 - Telefono:
 - Francia: +33 563 825 319
 - Germania: +49 69 710 480 480
 - Regno Unito: +44 3303 332 533
 - Sud Africa: +27 11 234 9636
 - Australia, Nuova Zelanda: +61 1800 107 884
 - Altri Paesi in Europa, Medio Oriente e Africa: +971 4 253 3218
 - Fax: +33 563 825 301
 - E-mail: support@cepheideurope.com

Discussione, domande e risposte

