

Formación en el ensayo: Xpert[®] Carba-R

Servicio técnico de Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid[®]**
A better way.

Programa de formación

- **Formación sobre el ensayo Xpert Carba-R**
 - **Reactivos**
 - **Recogida de muestras**
 - **Conservación y manipulación del kit**
 - **Precauciones**
 - **Preparación del cartucho**
- **Control de calidad**
- **Análisis de resultados**
- **Discusión y preguntas y respuestas**



Objetivos de la formación en Xpert Carba-R

Al final de la formación, el usuario será capaz de:

- **Conservar y manipular como es debido los kits de cartucho Xpert Carba-R.**
- **Tomar las precauciones de seguridad de laboratorio adecuadas.**
- **Recoger tipos de muestras apropiados y transportar las muestras.**
- **Llevar a cabo la preparación del cartucho y realizar el ensayo.**
- **Notificar los diversos resultados generados por el software.**
- **Entender la estrategia de control del ensayo.**

Introducción sobre el estado de la enfermedad

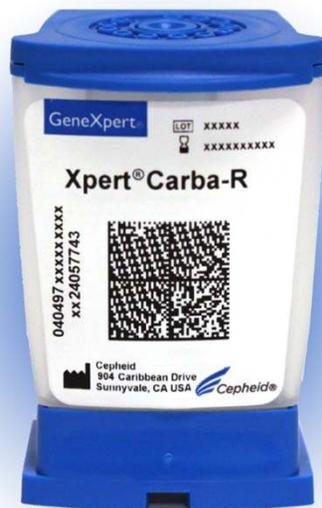
¿Qué es la resistencia al carbapenemo (Carba-R)?

- **Los carbapenemos son un tipo de antibióticos betalactámicos, que se utilizan con frecuencia como antibiótico de último recurso.**
 - **La resistencia al carbapenemo (Carba-R) es el resultado de genes de resistencia cromosómica o mediada por plásmidos sumamente móviles, que se asocian a organismos entéricos gramnegativos y a bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.**
 - **La infección con organismos no sensibles al carbapenemo se asocia a una mortalidad elevada (hasta del 40 % al 50 %).¹**
 - **Las pruebas de cribado para detectar la colonización en pacientes pueden agilizar las prácticas de control de la infección y reducir la probabilidad de propagación intrahospitalaria.**



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 solución Cepheid



- **Detección y diferenciación simultáneas**
 - Cinco dianas en los genes de Carba-R
 - Dos controles internos para cada muestra individual
 - Control de procesamiento de muestras (SPC)
 - Control de comprobación de la sonda (PCC)
- **Altas sensibilidad y especificidad**
- **Sencillo y de fácil uso**
 - Sistema de cartucho cerrado
- **Resultados en 48 minutos**
- **Resultados a petición, 24 horas al día y 7 días a la semana**
- **Acceso aleatorio**

Indicaciones

El ensayo Cepheid Xpert Carba-R Assay, realizado en los sistemas del instrumento GeneXpert[®], es una prueba de diagnóstico cualitativo *in vitro* concebida para la detección y la diferenciación rápidas de las secuencias de genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{IMP-1} asociadas a la ausencia de sensibilidad al carbapenemo en bacterias gramnegativas obtenidas de muestras de hisopos rectales de pacientes con riesgo de colonización intestinal con bacterias no sensibles al carbapenemo. La prueba utiliza la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) automatizada, en tiempo real. El Xpert Carba-R Assay está indicado para facilitar la detección de bacterias no sensibles al carbapenemo que colonizan pacientes en entornos sanitarios. El Xpert Carba-R Assay no está indicado para guiar o vigilar el tratamiento de infecciones por bacterias no sensibles al carbapenemo.

Es necesario realizar cultivos adicionales a fin de recuperar microorganismos para la tipificación epidemiológica, para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana y para la identificación confirmatoria adicional de bacterias no sensibles al carbapenemo.

Requisitos del sistema y de los reactivos

Sistemas GeneXpert

- **Módulos de 6 colores**
- **Software GX DX v4.3 o posterior**

Kits de la prueba (CE-IVD)

- **GXCARBAR-CE-10**

Kits de recogida de muestras

- **Número de catálogo de Cepheid 900-0370**

Kit Xpert Carba-R

	Xpert Carba-R Assay
Número de catálogo	GXCARBAR-CE-10
Pruebas por kit	10
Contenido por cartucho de la prueba	Reactivos secos y líquidos
Pipetas de transferencia	10
Frascos de reactivos para muestras	10
Conservación	De 2 °C a 28 °C



Recogida, transporte y conservación de muestras para el Xpert Carba-R



Cepheid Sample Collection Device
(dispositivo de recogida de muestras de Cepheid)
(REF 900-0370)

MARCA RANURADA

- **Tipo de muestra:**
 - **Recogida con hisopos rectales.**
- **Recogida de muestras:**
 - **Obtenga un par de hisopos rectales unidos introduciendo con cuidado sus dos puntas aproximadamente 1 cm más allá del esfínter anal y girándolas lentamente.**
- **Transporte y conservación de muestras:**
 - **Nada más recoger la muestra, el hisopo puede conservarse a una temperatura de 15 °C a 28 °C durante 6 horas como máximo, Posteriormente, el hisopo puede conservarse a una temperatura de 2 °C a 28 °C durante 7 días.**

Recogida de muestras

Protocolo de recogida de muestras rectales

GeneXpert®

para uso con los ensayos Xpert®:

- Xpert Carba-R

1



Debe usarse un hisopo doble Copan Venturi Transystem para recoger la muestra. Dispositivo de recogida Cepheid n.º 900-0370

2



Inserte con cuidado las puntas de ambos hisopos aproximadamente 1 cm más allá del esfínter anal y gírelos suavemente.

3



Vuelva a colocar los hisopos en el tubo.

4



Las muestras que pueden analizarse en el plazo de 6 horas pueden conservarse a una temperatura de 15 °C a 28 °C. Las muestras conservadas a una temperatura de 2 °C a 28 °C son estables durante un plazo máximo de 7 días.

definimos los diagnósticos moleculares *a petición*

© 2014 Cepheid

 **Cepheid.**
Bring answers to life.

301-33438 Rev. A, Junio 2014

Buenas prácticas de laboratorio

Preparación del laboratorio para la PCR

- Preparación del cartucho/reactivos → Adición de muestras → Detección

Conservación de muestras y reactivos

- Conserve las muestras separadas de los reactivos para evitar que estos se contaminen.

Equipo

- Utilice puntas de pipeta con filtro, cuando sea necesario, para las diluciones de control de calidad.
- Siga las recomendaciones del fabricante para la calibración y el mantenimiento del equipo de laboratorio.

Buenas prácticas de laboratorio (continuación)

Limpieza

- Limpie las superficies de trabajo con una dilución de lejía doméstica a una concentración final de 1:10 y, a continuación, con una solución de etanol al 70 % o isopropanol al 70 %. Seque las superficies de trabajo con un paño.
- Si se produce contaminación, limpie a fondo el área contaminada con una dilución de lejía doméstica 1:10, DNA AWAY o peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3 % (p/v), y enjuague a fondo con agua. Seque las superficies de trabajo con un paño.

Personal

- Lleve guantes y batas de laboratorio limpios.
- Cámbiese los guantes cada vez que procese muestras diferentes.

Área de la mesa del laboratorio

- Limpie rutinariamente el área de la mesa del laboratorio.
- Mantenga la parte posterior del instrumento sin polvo.

Conservación y manipulación del kit Xpert Carba-R



- **Conserve los kits de prueba a una temperatura de 2 °C a 28 °C. No utilice cartuchos caducados.**
- **Cada cartucho de un solo uso se utiliza para procesar una sola prueba. No vuelva a utilizar los cartuchos procesados.**
- **No abra un cartucho hasta que esté listo para añadir la muestra eluída del hisopo al cartucho.**
 - **El cartucho debe colocarse en el instrumento en un plazo de 30 minutos tras añadir la muestra al cartucho.**
- **Evite la contaminación cruzada durante los pasos de manipulación de las muestras.**
 - **Cámbiese los guantes cada vez que procese una muestra.**
 - **Cámbiese los guantes antes de abandonar la zona de trabajo y al entrar en la zona de trabajo.**
- **No utilice cartuchos que se hayan caído después de extraerlos del envase.**
- **No agite el cartucho. Si el cartucho se agita o se deja caer después de haber abierto su tapa, es posible que se obtengan resultados no válidos.**
- **No utilice cartuchos con tubos de reacción dañados.**

Preparación del cartucho Xpert Carba-R

Preparación del cartucho Xpert® - Carba-R

Consulte el prospecto para obtener instrucciones detalladas, precauciones y advertencias.

Para obtener un ejemplar de la hoja de datos de seguridad, visite www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com

Servicio técnico de Cepheid

Oficina en EE.UU.

(888) 838-3222

techsupport@cepheid.com

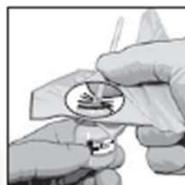
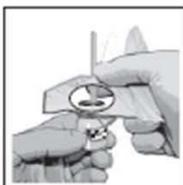
Oficina en Europa

+33 563 82 53 19

support@cepheid.eu



- 1 Obtenga un cartucho Xpert y un vial de reactivo de la muestra para cada muestra.
- 2 Inserte el hisopo en el vial del reactivo de la muestra.
- 3 Rompa el hisopo en la marca ranurada cerca de la abertura del vial.
- 4 Vuelva a tapar el vial del reactivo de la muestra y agítelo en el mezclador vortex durante 10 segundos.
- 5 Abra la tapa del cartucho Xpert.
- 6 aspire el reactivo de la muestra hasta la línea de la pipeta suministrada.
- 7 Vacíe la pipeta en la cámara de la muestra.
- 8 Cierre la tapa del cartucho Xpert.
- 9 Inicie la prueba dentro de los límites de tiempo especificados en el prospecto.



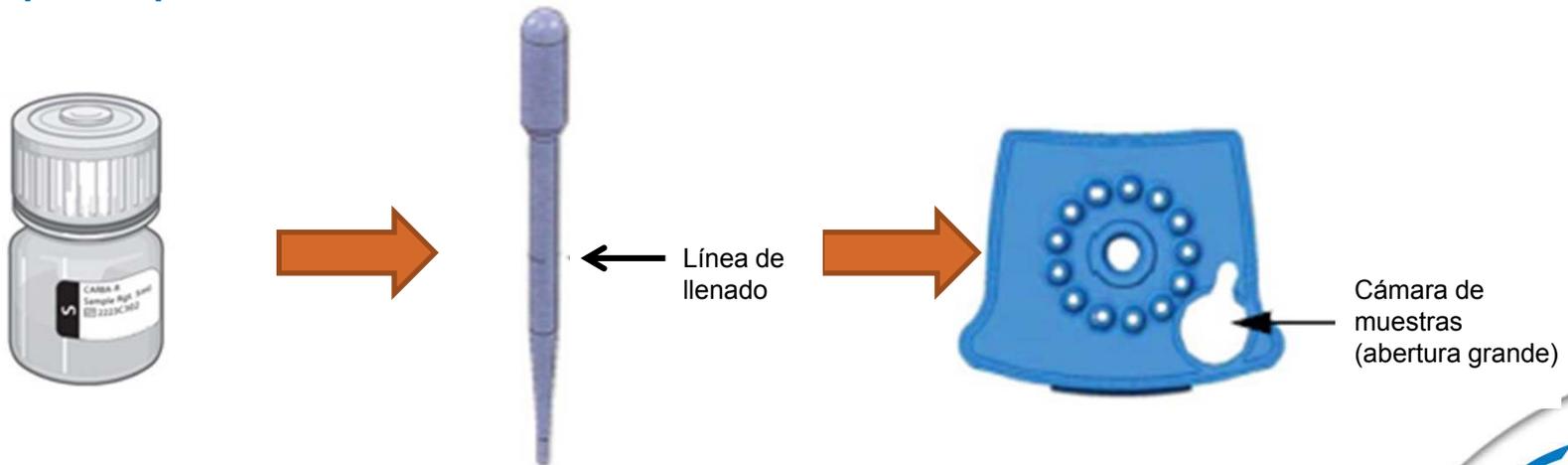
Nota: No sujete el hisopo por debajo de la marca ranurada. Utilice un paño o un artículo equivalente para minimizar el riesgo de contaminación.

© 2014 Cepheid

301-32928 Rev. A Julio 2014

Realización de la prueba

- Coloque un hisopo individual en el frasco de reactivo para muestras; con una gasa estéril, rompa el hisopo a la altura de la marca ranurada para reducir al mínimo el riesgo de contaminación.
 - Introduzca el hisopo no utilizado en el tubo de transporte y consérvelo a una temperatura de 2 °C a 28 °C.
- Agite el frasco de reactivo para muestras en un agitador vórtex durante 10 segundos a alta velocidad.
- Abra el frasco de reactivo para muestras.
- Llene la pipeta de transferencia hasta la marca.
 - Evite que se formen burbujas de agua.
 - La muestra restante en el frasco de reactivo para muestras puede conservarse a una temperatura de 2 °C a 28 °C durante un máximo de 4 días en caso de que sea necesario repetir la prueba.



Realización de la prueba



Control de calidad

Consulte el prospecto para obtener más detalles



 **Cepheid**[®]
A better way.

Estrategia de control del ensayo Cepheid

- **Cada cartucho Xpert es un dispositivo analítico autónomo.**
 - **Cepheid ha diseñado métodos moleculares específicos para incluir controles internos que permiten al sistema detectar modos de fallo específicos dentro de cada cartucho.**
 - **Control del sistema del instrumento: Comprobación del estado**
 - **Control del reactivo: Comprobación de la sonda**
 - **Control de procesamiento de muestras: SPC y/o SAC**
 - **Control de la amplificación: SPC y/o SAC y/o IC**

Control del sistema del instrumento: Comprobación del estado

- **El control del sistema del instrumento comprueba los componentes ópticos, la temperatura del módulo y la integridad mecánica de cada cartucho.**
 - **Si no se superan los controles del sistema, el resultado notificado de la prueba será de ERROR.**

Control del reactivo: Control de comprobación de la sonda

- **Tras la preparación de la muestra, la reconstitución de las microesferas y el llenado del tubo (antes del termociclado), se toman varias lecturas de fluorescencia a diferentes temperaturas.**
- **Las lecturas se comparan con unos valores predeterminados establecidos por Cepheid.**
- **La comprobación de la sonda controla:**
 - **La ausencia del reactivo específico de la diana (TSR) o de las microesferas de reactivo enzimático, que contienen todos los cebadores, las sondas y la plantilla de control interno**
 - **La reconstitución incompleta del reactivo**
 - **El relleno incompleto del tubo de reacción**
 - **La degradación de las sondas**
- **Si no se supera la comprobación de la sonda, el resultado notificado de la prueba será de ERROR.**

Control de procesamiento de muestras - SPC

- El control de procesamiento de muestras (SPC) determina la eficacia de los pasos de preparación de muestras, incluido el llenado del tubo de reacción.
- El SPC son esporas de *Bacillus globigii*.
- El SPC controla:
 - Si falta cebador, sonda o microesferas de enzimas
 - La reconstitución incompleta del reactivo
 - El relleno incompleto del tubo de reacción
 - La degradación de enzimas
 - La lisis de la muestra, la extracción del ácido nucleico y la integridad de este
 - La inhibición de las muestras
- El SPC puede ser negativo o positivo en una muestra positiva para analito.
- Si el SPC no se supera en una muestra negativa para analito, el resultado notificado de la prueba será de **NO VÁLIDO**.

Controles externos comerciales

Nombre de organismo	Betalactamasas presentes	Origen
<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

- **Otras opciones:**
 - Muestras positivas y negativas conocidas de pacientes

Análisis de resultados

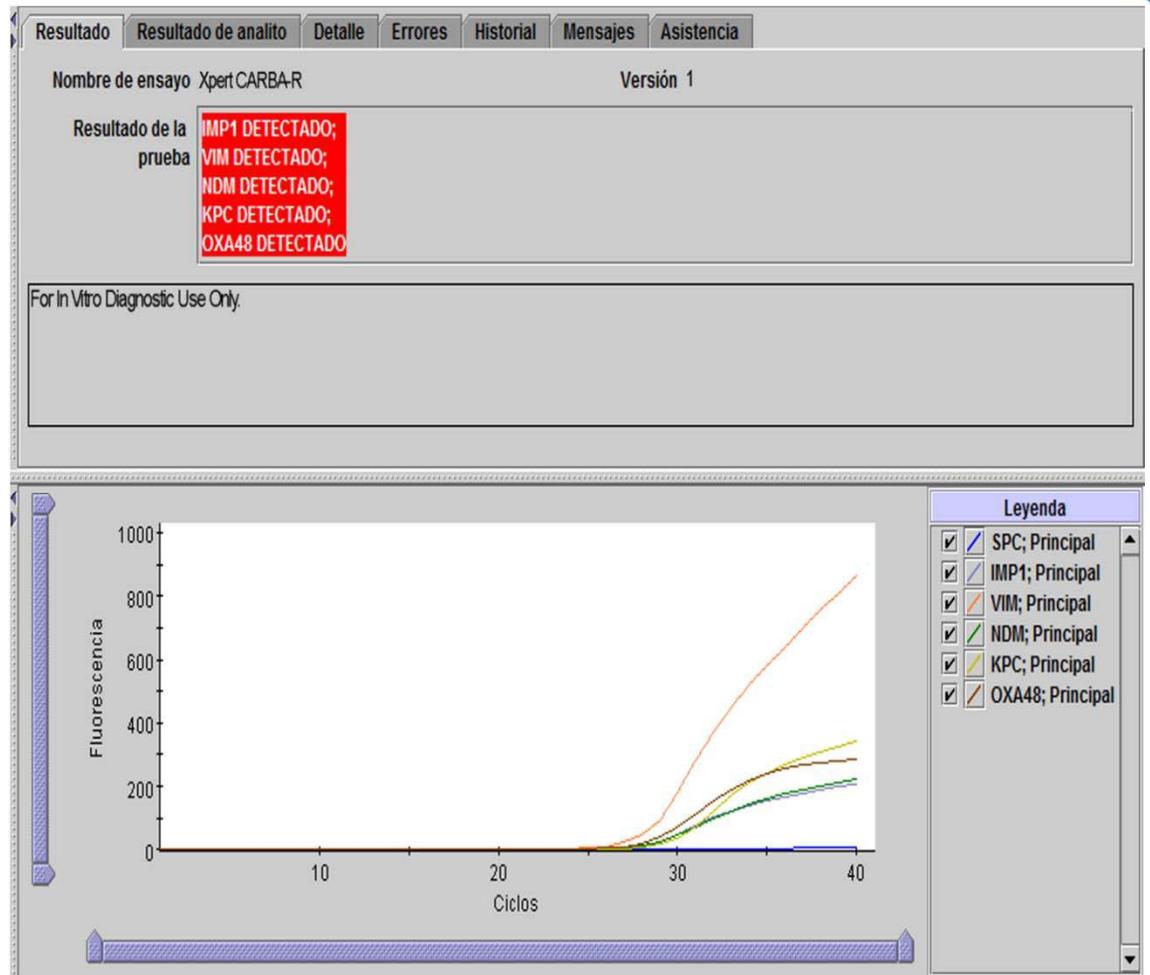
Consulte el prospecto para obtener más detalles



 **Cepheid**[®]
A better way.

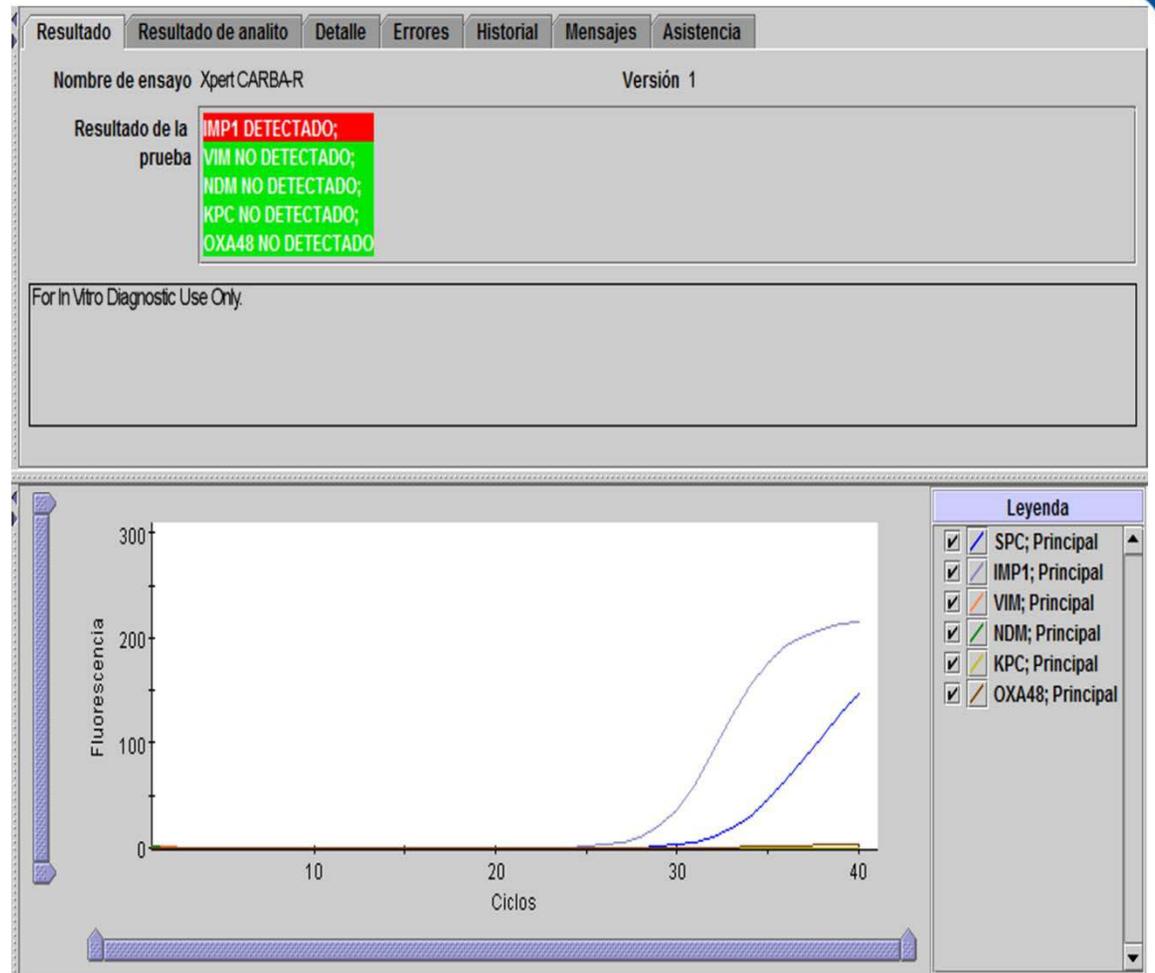
Resultados del ensayo Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Pos/ NDM Pos/ KPC Pos/ OXA48 Pos

- Se detectan secuencias de ADN diana de IMP1, VIM, NDM, KPC y OXA-48.
- SPC: No aplicable (N/A). El SPC se ignora porque las amplificaciones de ADN diana de IMP-1, VIM, NDM, KPC y OXA-48 pueden competir con este control.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.



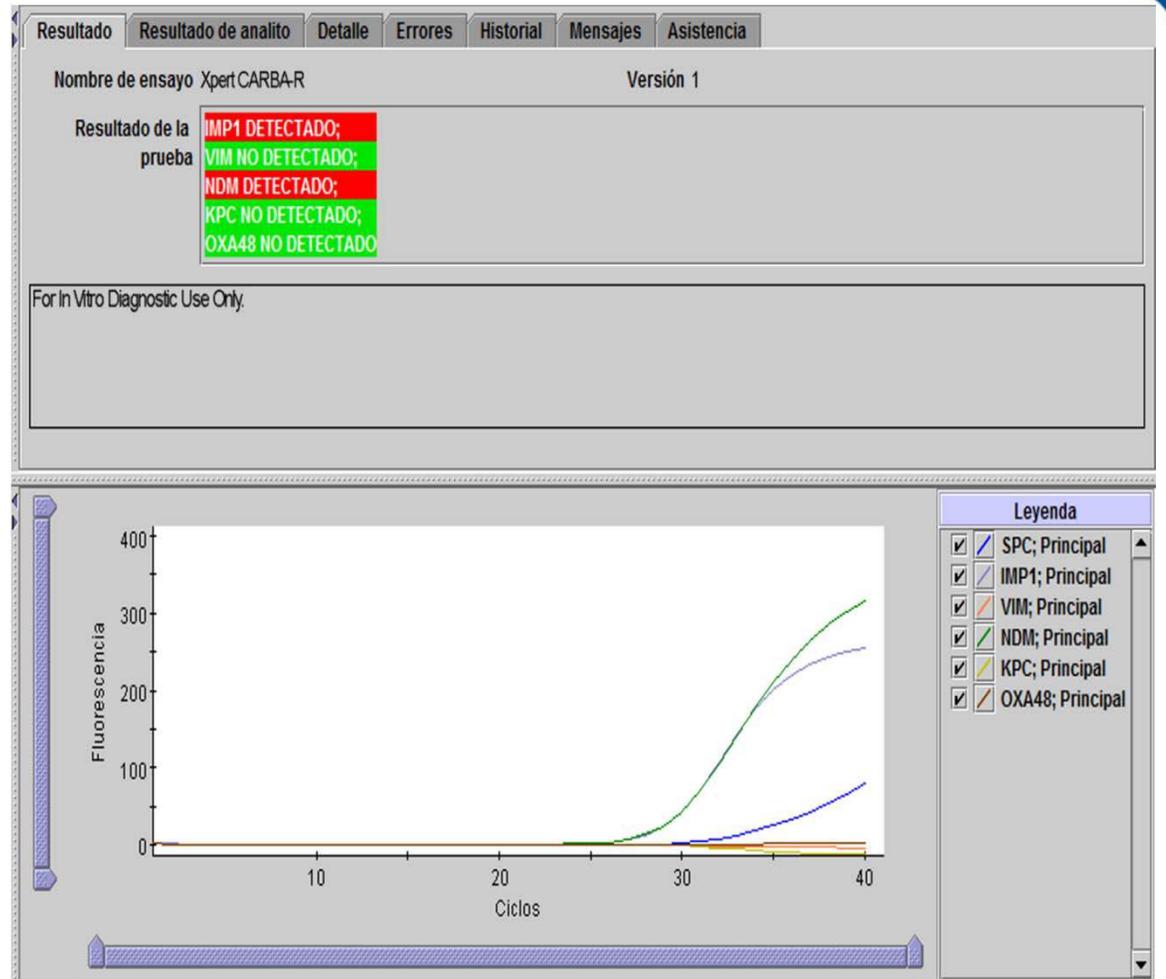
Resultados del ensayo Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Se ha detectado la secuencia de ADN diana de IMP1; no se han detectado las secuencias de ADN diana de VIM, NDM, KPC y OXA-48.
- SPC: No aplicable (N/A). El SPC se ignora porque la amplificación del ADN diana de IMP1 puede competir con este control.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.



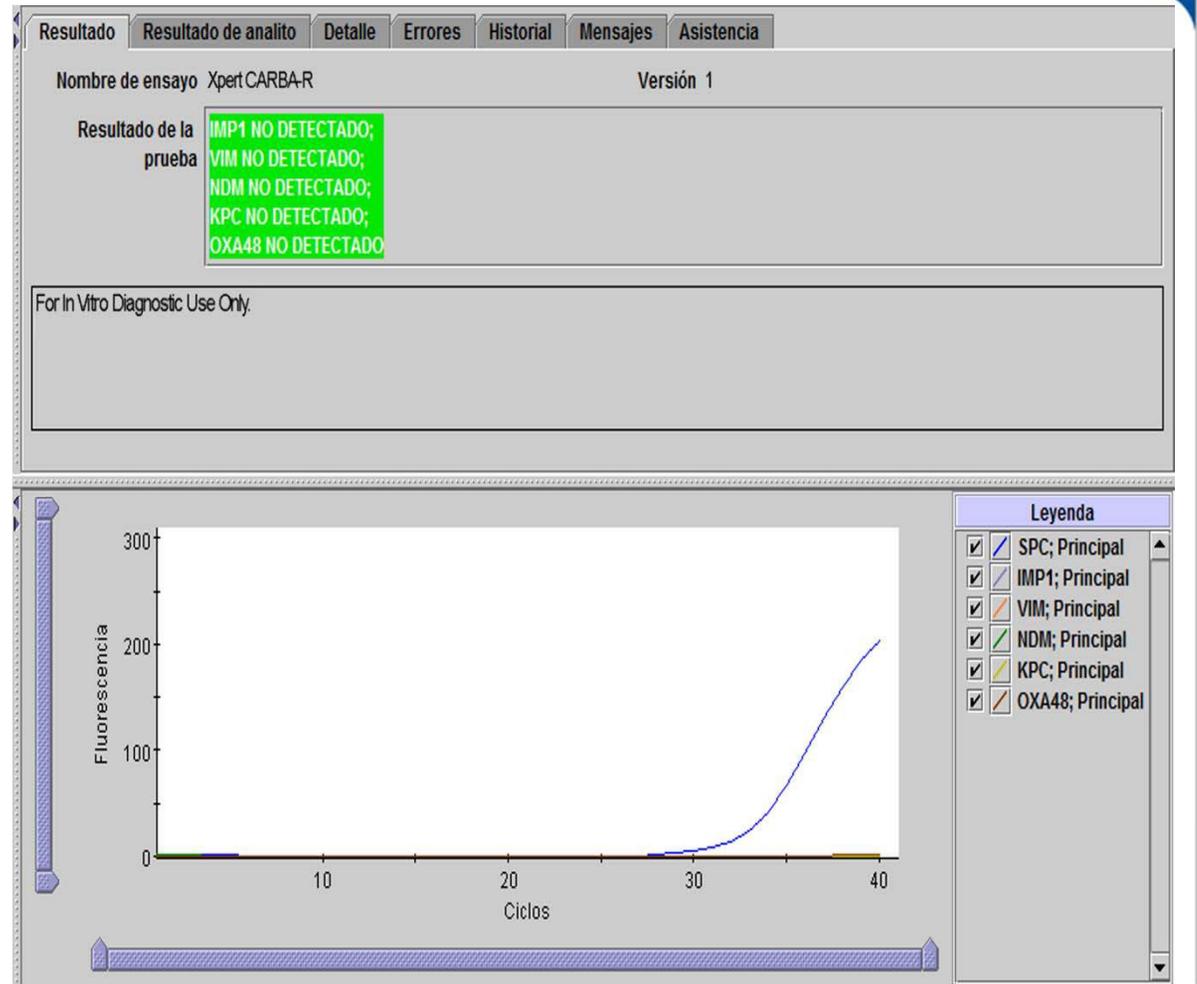
Resultados del ensayo Xpert Carba-R: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Pos/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Se han detectado las secuencias de ADN diana de IMP1 y NDM; no se han detectado las secuencias de ADN diana de VIM, KPC y OXA-48.
- SPC: No aplicable (N/A). El SPC se ignora porque la amplificación del ADN diana de IMP1 y NDM puede competir con este control.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.



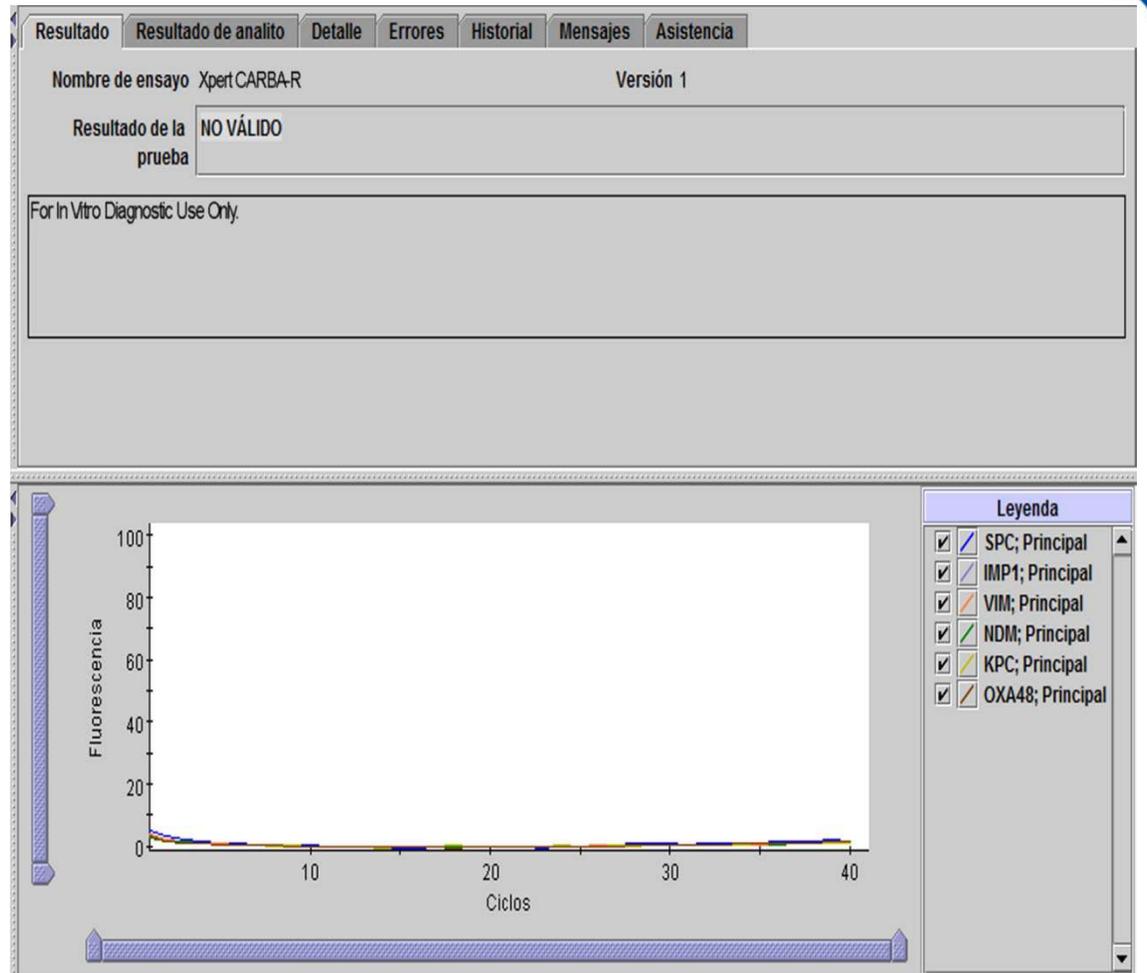
Resultados del ensayo Xpert Carba-R: IMP1 Neg/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- No se han detectado las secuencias de ADN diana de IMP1, VIM, NDM, KPC y OXA-48.
- SPC: SUPERADO; la amplificación por PCR de la secuencia de ADN del SPC arroja un valor de Ct dentro del rango válido y un punto final de fluorescencia por encima del valor mínimo configurado.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.



Resultados del ensayo Xpert Carba-R: NO VÁLIDO

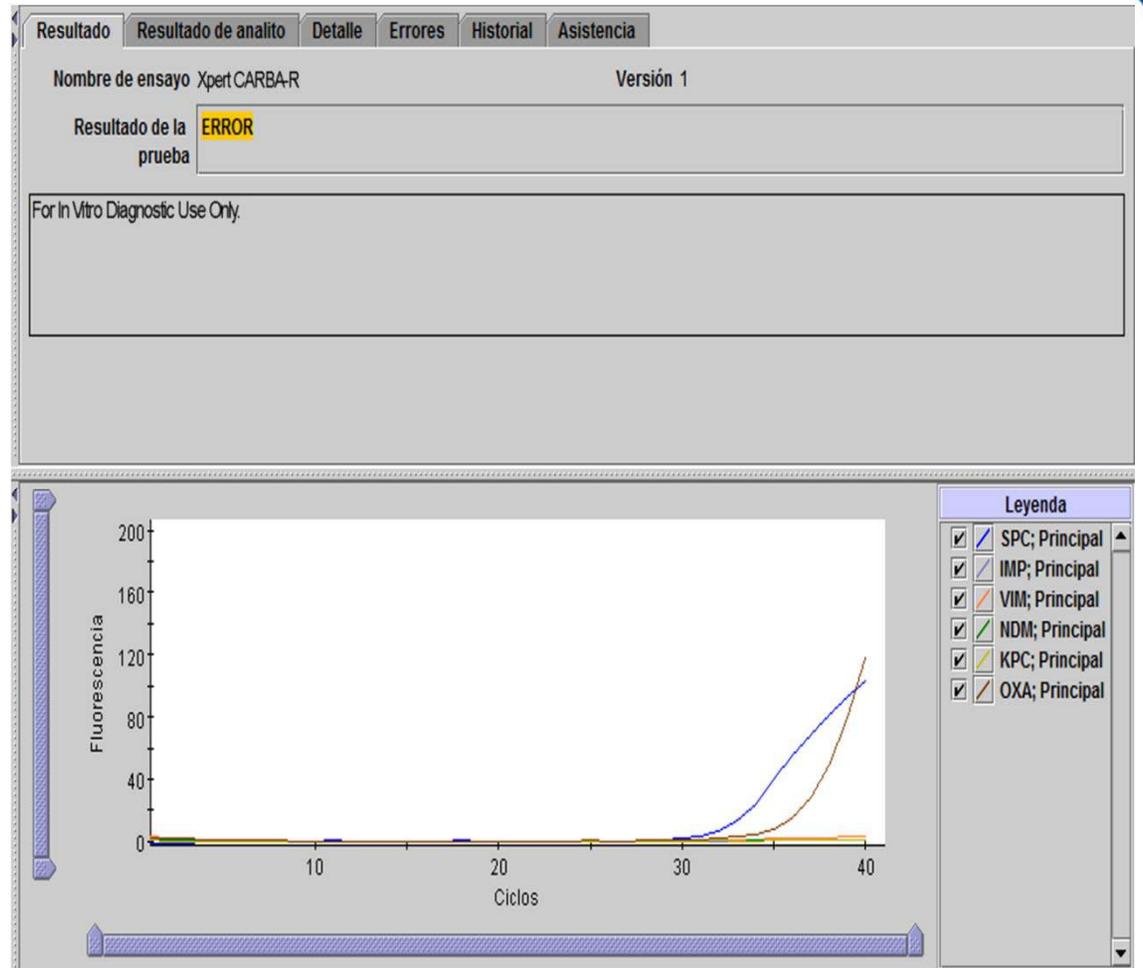
- No puede determinarse la presencia o ausencia de secuencias de ADN diana de IMP1, VIM, NDM, KPC y OXA-48.
- **SPC: NO SUPERADO;** ausencia de amplificación por PCR de la secuencia diana de ADN del SPC o el Ct del SPC no está dentro del rango válido y el punto final de fluorescencia está por debajo del valor mínimo configurado.
- **PCC: SUPERADO;** todos los resultados de la comprobación de la sonda superan la comprobación.



Resultado del ensayo Xpert Carba-R: ERROR

- No puede determinarse la presencia o ausencia de secuencias de ADN diana de IMP1, VIM, NDM, KPC y OXA-48.
- SPC: SIN RESULTADO
- PCC: NO SUPERADO*; todos o uno de los resultados de la comprobación de la sonda no superan la comprobación. El PCC falló, debido probablemente a que el tubo de reacción no se llenó correctamente o se detectó un problema de integridad de la sonda.

* Si la comprobación de sondas se superó, el error se debe a un fallo en los componentes del sistema.



Resultado del ensayo Xpert Carba-R: SIN RESULTADO

- No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN diana de Carba-R. Siga las instrucciones del apartado 13, **Procedimiento de repetición de la prueba** del prospecto para repetir la prueba. No se obtuvieron suficientes datos para producir un resultado de la prueba (por ejemplo, el usuario paró la prueba que estaba en curso).
- SPC: SIN RESULTADO
- PCC: No aplicable

Motivos para repetir el ensayo

- Un resultado **NO VÁLIDO** indica que el control SPC falló. La muestra no se procesó correctamente o la PCR se inhibió.
- Un resultado de **ERROR** indica que el control de comprobación de sondas falló y que el ensayo se interrumpió posiblemente debido a que el tubo de reacción no se había llenado bien, a la detección de un problema de integridad de la sonda de reactivo o a que se excedieron los límites máximos de presión.
- **SIN RESULTADO** indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detiene una prueba en curso.

Factores que afectan negativamente a los resultados

- **Recogida inadecuada de muestras**
 - No se ha determinado la eficacia diagnóstica lograda con otros dispositivos de recogida y con otros tipos de muestra.
 - En los ensayos que contienen el control SAC, las muestras que no contengan células humanas arrojarán resultados no válidos.
- **Transporte o conservación inadecuados de la muestra recogida**
 - Las condiciones de conservación y transporte son específicas de cada tipo de muestra.
 - Consulte las instrucciones del prospecto para la manipulación adecuada.
- **Procedimiento inadecuado de realización de la prueba**
 - La modificación de los procedimientos de realización de la prueba puede afectar a la eficacia diagnóstica de esta.
 - Los errores técnicos o la confusión de muestras pueden afectar a los resultados de la prueba.
 - Para evitar resultados erróneos es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones del prospecto.
- **Sustancia interferente**
 - Si hay presente alguna sustancia interferente, la prueba puede arrojar resultados negativos falsos o no válidos.
- **El número de microorganismos que hay en la muestra es inferior al límite de detección de la prueba**
- **Consulte la tasa de indeterminados en el prospecto**

Sustancias interferentes

- **De las 23 sustancias potencialmente inhibidoras analizadas, el Pepto-Bismol (subsalicilato de bismuto) al 0,25 % (p/v) tuvo un efecto inhibidor estadísticamente significativo sobre la detección de IMP-1 en el Xpert Carba-R Assay. No se observaron otros efectos inhibidores estadísticamente significativos.**
- **Consulte el prospecto del ensayo Xpert Carba-R para obtener más información sobre las sustancias potencialmente interferentes.**

Procedimiento de repetición de la prueba Carba-R

1	Deseche el cartucho utilizado.	
2	Extraiga un nuevo cartucho Xpert Carba-R, un nuevo frasco de reactivo para muestras y una nueva pipeta de transferencia del kit de pruebas.	
3	Transfiera el líquido restante desde el frasco de reactivo para muestras original (conservado ≤ 4 días a $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$) al nuevo frasco de reactivo para muestras.	
4	Repita la prueba con un cartucho nuevo.	
5	Siga las instrucciones del prospecto para la realización de la prueba.	

Discusión y preguntas y respuestas



 **Cepheid**[®]
A better way.

Servicio técnico

- **Cepheid ofrece servicio técnico in situ, por teléfono, por fax y por correo electrónico.**
- **Norteamérica:**
 - **Teléfono: +1 (888) 838-3222**
 - **Fax: +1 (408) 716-2550**
 - **Correo electrónico: techsupport@cepheid.com**
- **Europa, África, Oriente Próximo y Península Índica:**
 - **Teléfono:**
 - Francia: +33 563 825 319**
 - Alemania: +49 69 710 480 480**
 - Reino Unido: +44 3303 332 533**
 - Sudáfrica: +27 11 234 9636**
 - Australia y Nueva Zelanda: +61 1800 107 884**
 - Otros países europeos, de Oriente Próximo y africanos: +971 4 253 3218**
 - **Fax: +33 563 825 301**
 - **Correo electrónico: support@cepheideurope.com**

Discusión y preguntas y respuestas

