

Formation au test : Xpert[®] Norovirus

Service d'assistance technique de Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid**[®]
A better way.

Calendrier de formation

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



Objectifs de la formation Xpert Norovirus

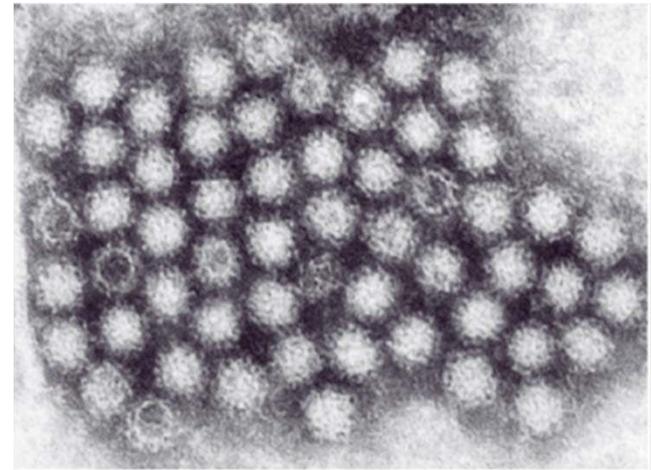
Au terme de la formation, l'utilisateur doit être capable de :

- **Conserver et manipuler correctement la cartouche Xpert Norovirus et kit de test.**
- **Suivre les précautions correctes de sécurité en laboratoire.**
- **Recueillir un échantillon approprié 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 maladie

Qu'est-ce que le norovirus ?

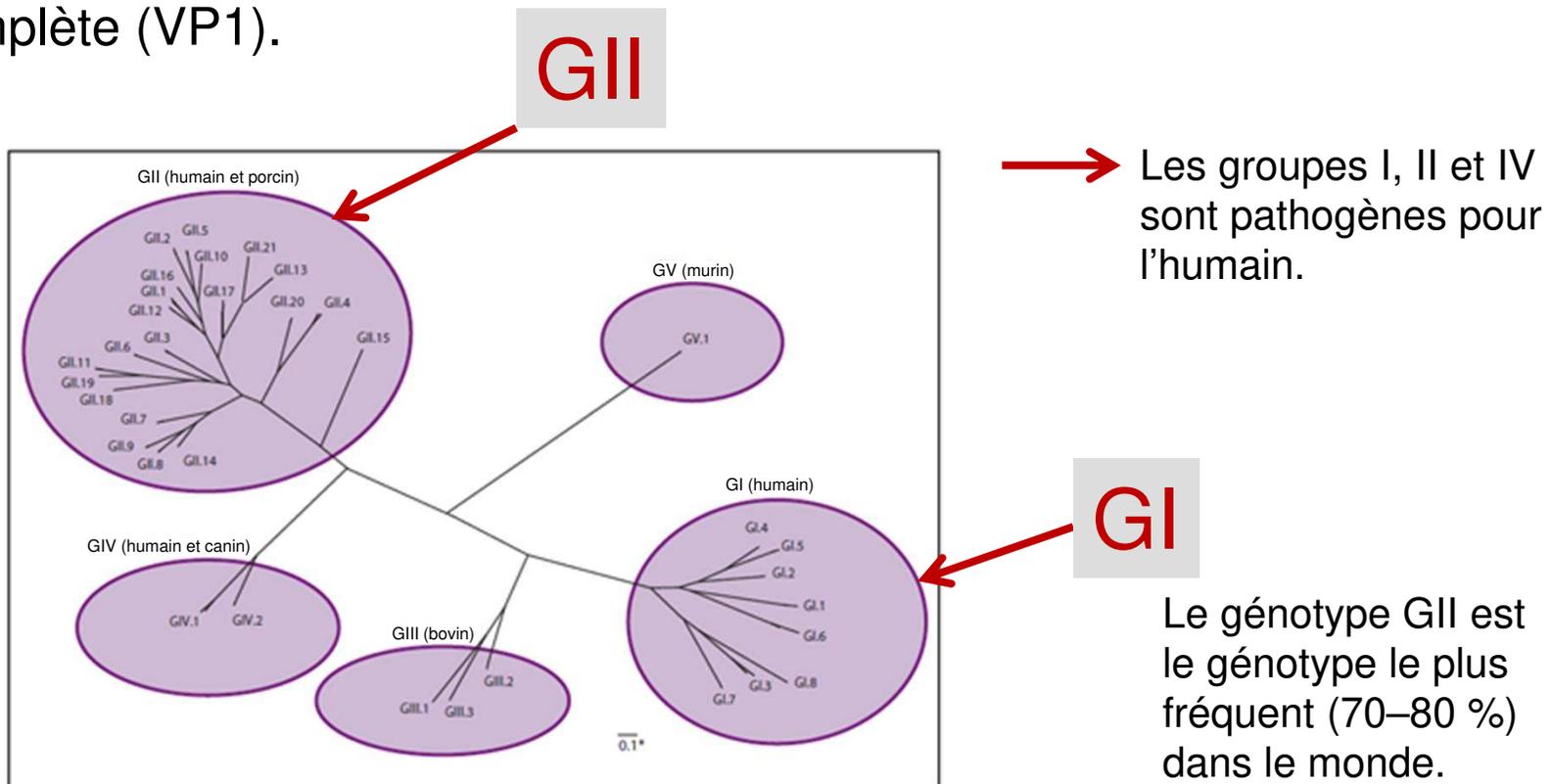
- Le norovirus est la cause la plus fréquente de gastro-entérite (diarrhée et vomissement) infectieuse ; il est responsable de 50 % des gastro-entérites virales dans le monde.¹
- C'est un virus à ARN fortement contagieux qui peut être transmis par de l'eau ou des aliments contaminés par des fèces, par contact entre personnes ou par aérosolisation.
- Les patients immunodéprimés, notamment les personnes âgées et les enfants, présentent un plus grand risque d'infection.
- Les accès de norovirus dans les établissements de soins de santé nécessitent la mise en œuvre immédiate de mesures de contrôle de l'infection et la fermeture de services.
- Les patients suspectés d'infection peuvent être placés en isolement dans l'attente du résultat.
- Le norovirus du génogroupe I (GI) et le norovirus du génogroupe II (GII) sont responsables de la majorité des cas chez l'humain.



¹ CDC MMWR 2011.60 (3)

Classification des norovirus

Les norovirus sont classés en 5 génogroupes (I – V) et 32 génotypes, sur base de différences de séquence dans la protéine capsidique complète (VP1).



La solution Cepheid



- **Détection simultanée**
 - **GI et GII**
- **Deux contrôles pour chaque échantillon individuel**
 - **Contrôle de traitement de l'échantillon (CTE)**
 - **Contrôle de vérification de la sonde**
- **Sensibilité et spécificité élevées**
- **Facilité et simplicité d'utilisation**
 - **Système de cartouche fermée**
- **Résultats en environ 90 minutes**
 - **CPT (clôture précoce du test)**
- **Résultats à la demande, 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7**
- **Accès aléatoire**

Utilisation prévue

Le test Xpert Norovirus Assay effectué avec les systèmes d'instrument GeneXpert® Cepheid est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* destiné à l'identification et la différenciation rapides du norovirus des génogroupes I et II dans des échantillons bruts (sans conservateur) de selles non formées, recueillis auprès de patients présentant des symptômes de gastro-entérite aiguë. Le test utilise une méthode automatisée de réaction en chaîne par polymérase en temps réel après transcription inverse (rRT-PCR) pour détecter l'ARN de norovirus. Le test Xpert Norovirus Assay est destiné à faciliter le diagnostic des infections à norovirus.

Systeme et reactifs necessaires

Systemes GeneXpert

- Logiciel GX DX version 4.3 ou superieure

Kits de test (CE-IVD)

- GXNOV-CE-10

Matériel supplémentaire nécessaire mais non fourni

- Écouvillon sec jetable à usage unique (SDPS-120)
- Pipettes de transfert jetables
- Mélangeur vortex

Kit Xpert Norovirus

	Xpert Norovirus Assay
Numéro de catalogue	GXNOV-CE-10
Tests par kit	10
Flacons de réactif échantillon par kit	10
Contenu par cartouche de test	Billes de réactif
	Réactifs liquides
IT Dt	Fichier de définition du test (Assay Definition File, ADF)
	Instructions pour l'importation du fichier ADF
	Notice (PDF)
Stockage	2 °C – 8 °C



Prélèvement, transport et conservation des échantillons Xpert Norovirus

- **Type d'échantillon :**
 - Échantillons bruts (sans conservateur) de selles non formées dans un récipient propre
- **Prélèvement de l'échantillon :**
 - Observer les directives de l'établissement pour le prélèvement des échantillons pour les tests de norovirus
- **Transport et conservation des échantillons :**
 - Transporter à 2 °C – 8 °C
 - Conserver à 2 °C – 8 °C pendant maximum 2 jours après la date de prélèvement

Bonnes pratiques de laboratoire

Préparation dans le labo 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 une contamination de réactif.

Équipement

- Utiliser des pointes de pipette avec filtre quand nécessaire pour les dilutions de CQ.
- Suivre les recommandations du fabricant pour l'étalonnage et l'entretien de l'équipement de laboratoire.

Bonnes pratiques de laboratoire (suite)

Nettoyage

- Nettoyer les surfaces de travail avec une dilution d'eau de Javel ménagère à 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 soigneusement la surface contaminée avec une dilution d'eau de Javel ménagère à 1/10, du DNA AWAY ou du peroxyde d'hydrogène à 3 % (p/v), puis rincer abondamment à l'eau. Essuyer les surfaces de travail pour les sécher.

Personnel

- Porter une blouse de laboratoire et des gants propres.
- Changer de gants entre chaque traitement d'échantillon.

Surface de la paillasse

- Nettoyer régulièrement la surface de la paillasse.
- Maintenir l'arrière de l'instrument exempt de poussières.

Conservation et manipulation du kit Xpert Norovirus



- **Conserver les kits de test à 2 °C – 8 °C. Ne pas utiliser des cartouches périmées.**
- **Chaque cartouche à usage unique est utilisée pour effectuer un seul test unique. Ne pas réutiliser des cartouches usagées.**
- **Ne pas ouvrir une cartouche avant d'être prêt à l'utiliser.**
 - **La cartouche doit être utilisée dans les 30 minutes qui suivent l'ouverture du couvercle.**
- **Éviter toute contamination croisée pendant les étapes de manipulation des échantillons.**
 - **Changer de gants s'ils ont été mis en contact avec l'échantillon où s'ils sont mouillés.**
 - **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 ou qui a été agitée après le transfert de l'échantillon dans la cartouche.**
- **Ne pas utiliser une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.**

Écouvillon de traitement d'échantillon Norovirus



REPÈRE

**Écouvillon jetable à usage unique Cepheid,
n° de catalogue SDPS-120**

Xpert Norovirus – Volume correct d'échantillon



Échantillon insuffisant



Volume correct



Échantillon excessif

Protocole du test Xpert Norovirus Assay

Préparation de la cartouche Xpert®

- Xpert MRSA
- Xpert MRSA/SA SSTI
- Xpert C. difficile
- Xpert SA Nasal Complete
- Xpert vanA/vanB
- Xpert Norovirus

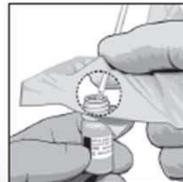
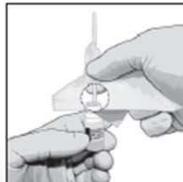
Consulter la notice pour obtenir les instructions détaillées, les précautions et les avertissements.

Pour obtenir un exemplaire de la SDS, consulter le site www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com

Service d'assistance technique de Cepheid
Bureau aux États-Unis
(888) 838-3222, choix 2
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 tout le contenu du flacon de réactif échantillon à l'aide d'une pipette de transfert jetable.
- 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

301-1049F, Rév. B mars 2014

Aperçu du protocole Xpert Norovirus



CPT (clôture précoce du test)

- **Qu'est-ce que c'est ?**
 - **Monitoring en temps réel du progrès de la réaction**
 - **Clôture de la réaction quand le seuil du cycle d'une réaction particulière est franchi**
- **Quels sont les avantages ?**
 - **Les résultats positifs sont immédiatement rapportés**
 - **Pour les interventions critiques en termes de délai, cela permet de gagner de précieuses minutes pour les patients qui en ont le plus besoin**

Contrôle qualité

Se reporter à la notice pour des informations plus détaillées



 **Cepheid**[®]
A better way.

Stratégie de contrôle du test Cepheid

- **Chaque cartouche Xpert est un dispositif de test clos.**
 - **Cepheid a développé des méthodes moléculaires spécifiques pour intégrer des contrôles internes qui permettent au système de détecter des modes de défaillance spécifiques dans chaque cartouche.**
 - **Contrôle du système d'instrument : Contrôle de l'état**
 - **Contrôle des réactifs : Vérification de la sonde**
 - **Contrôle de traitement de l'échantillon : CTE et/ou CAE**
 - **Contrôle de l'amplification : CTE et/ou CAE et/ou contrôle interne (CI)**

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

- **Le contrôle du système vérifie les composants optiques, la température du module et l'intégrité mécanique de chaque cartouche.**

–Si les contrôles du système échouent, le résultat du test rapporté sera « ERREUR ».

Contrôle des réactifs – CVS

- **Après la préparation de l'échantillon, la reconstitution des billes et le remplissage du tube (avant le cycle thermique), 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 du tube réactionnel**
 - **Dégradation des sondes**
- **Si la vérification des sondes échoue, le résultat du test rapporté sera « ERREUR ».**

Contrôles 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 est un Armored RNA (ARN blindé).**
- **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

Référence ZeptoMetrix	Description	Configuration
NATNOVI-ST	• Norovirus GI (positif)	1 mL
NATNOVII-ST	• Norovirus GII (positif)	1 mL
NATROTA-ST	• Rotavirus Wa (négatif)	1 mL

<http://www.zeptoMetrix.com>

•Autres options :

- Échantillons patients positifs et négatifs connus

•Les contrôles externes doivent être effectués conformément aux organismes d'accréditation locaux, régionaux ou nationaux, le cas échéant.

Analyse des résultats

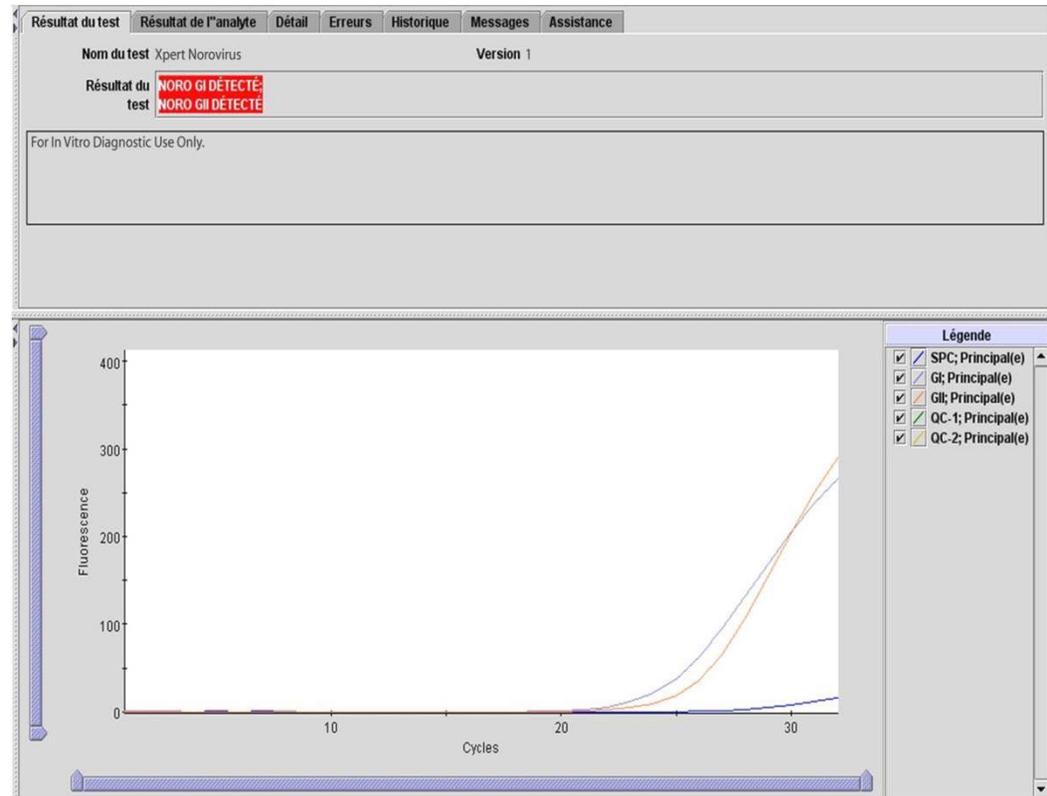
Consulter la notice plus de détails



 **Cepheid**[®]
A better way.

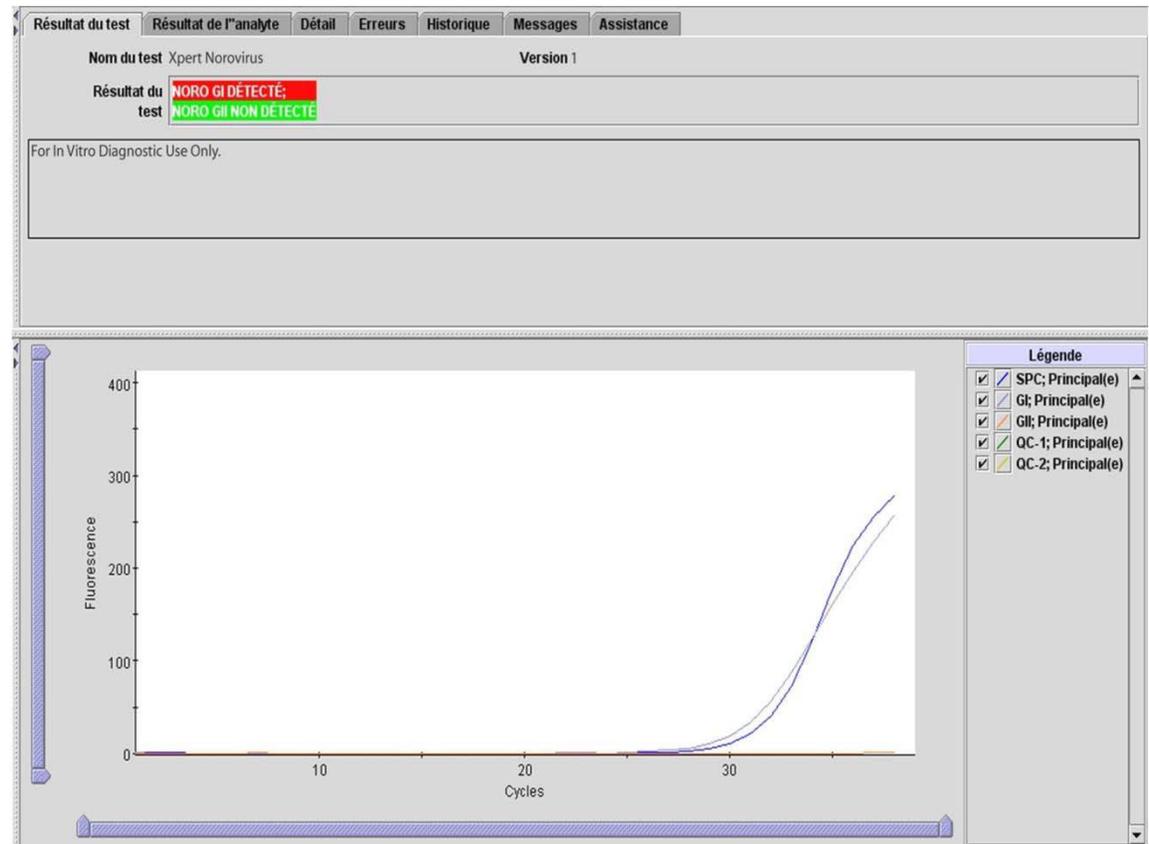
Résultats Xpert Norovirus : Noro GI détecté, Noro GII détecté

- Des séquences d'ARN cible de norovirus GI et GII sont détectées.
- CTE : Sans objet (SO). Le CTE est ignoré car l'amplification de la cible norovirus peut concurrencer ce contrôle.
- CVS : RÉUSSITE ; tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultats Xpert Norovirus : Noro GI détecté ; Noro GII non détecté

- Des séquences d'ARN cible de norovirus GI sont détectées.
- Des séquences d'ARN de norovirus GII ne sont pas détectées.
- CTE : Réussite ; le CTE a une valeur Ct dans la plage de validité et une limite est supérieure au réglage du seuil minimum.
- CVS : RÉUSSITE ; tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.

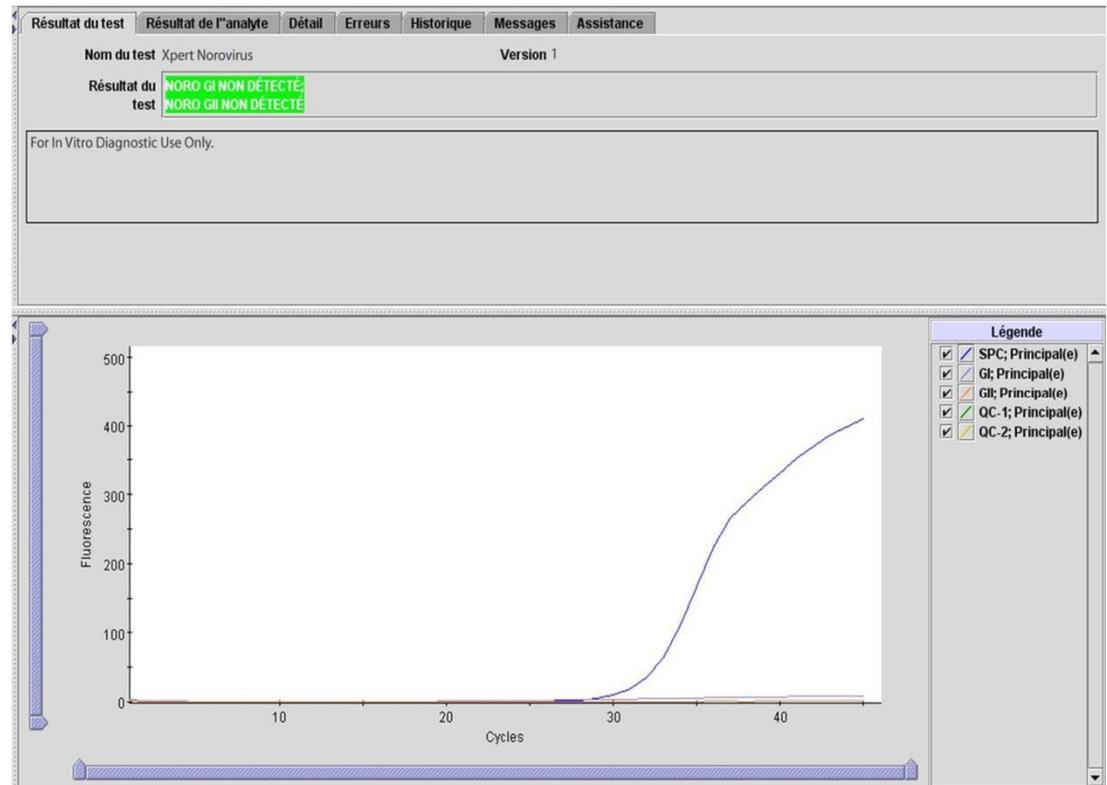


Résultats Xpert Norovirus : Noro GI non détecté ; Noro GII non détecté

•Des séquences d'ARN de norovirus GI et GII ne sont pas détectées.

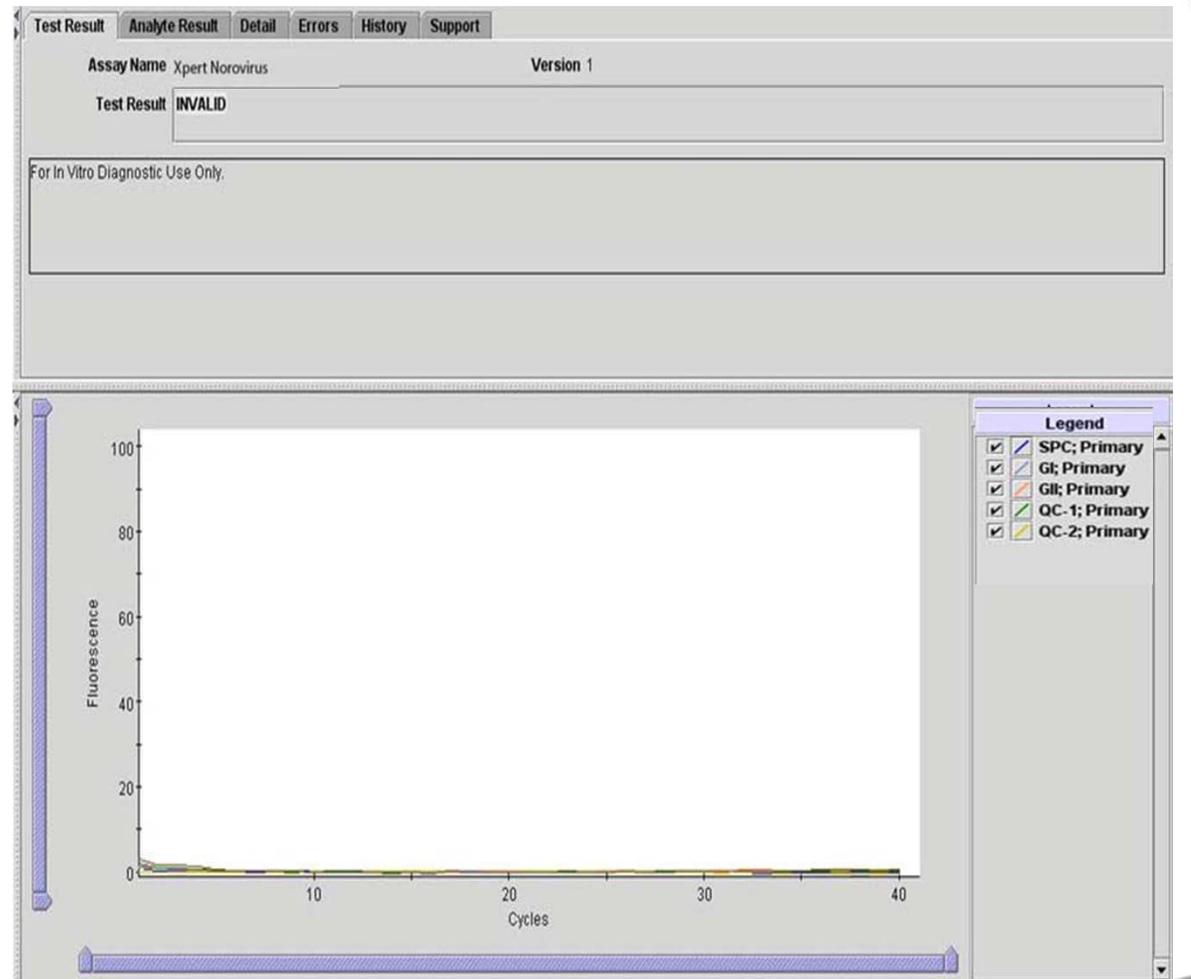
•CTE : Réussite ; le CTE a une valeur Ct dans la plage de validité et une limite est supérieure au réglage du seuil minimum.

•CVS : RÉUSSITE ; tous les résultats de vérification de la sonde ont réussi.



Résultats Xpert Norovirus : NON VALIDE

- La présence ou l'absence des séquences d'ARN cible de Norovirus est impossible à déterminer. Répéter le test en suivant les instructions de la section 14 « Procédure de répétition du test ».
- Le résultat CTE cible est négatif. 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 Xpert Norovirus : ERREUR

- La présence ou l'absence des séquences d'ARN cible de Norovirus est impossible à déterminer. Répéter le test en suivant les instructions de la section 14 « Procédure de répétition du test ».
- CTE : PAS DE RÉSULTAT
- CVS : ÉCHEC* ; échec d'un ou plusieurs résultats de vérification de la sonde. 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.

The screenshot displays the Xpert Norovirus test result interface. At the top, there are tabs for 'Test Result', 'Analyte Result', 'Detail', 'Errors', 'History', 'Messages', and 'Support'. The 'Test Result' tab is selected, showing 'Assay Name Xpert Norovirus' and 'Version 1'. Below this, the 'Test Result' is displayed as 'ERROR' in a yellow box. A section labeled 'For In Vitro Diagnostic Use Only.' is visible below the test result. The bottom part of the screenshot shows the 'Errors' tab selected, displaying a 'Troubleshoot' section with a table of error details.

#	Description	Detail	Time
1	Post-run analysis error	Error 5006: [GII] probe check failed. Probe check value of 55.4 for reading number 1 was above the maximum of 54.0	03/18/14 09:50:56
2	Post-run analysis error	Error 5006: [GII] probe check failed. Probe check value of 55.0 for reading number 3 was above the maximum of 54.0	03/18/14 09:50:56

Pas de résultat

Les données recueillies sont insuffisantes pour produire un résultat de test (par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours).

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

- Un résultat **NON VALIDE** indique que l'échantillon n'a pas été traité de manière appropriée, que la PCR a été inhibée, ou que l'échantillon n'était pas adéquat.
- Un résultat **ERREUR** indique un échec du contrôle de vérification de la sonde ou un dépassement des limites de pression maximales.
- Un résultat **PAS DE RÉSULTAT** indique que les données recueillies étaient insuffisantes. Par exemple, l'opérateur a arrêté un test qui était en cours, une erreur de chargement s'est produite ou le logiciel a été fermé prématurément.

Procédure de répétition du test Norovirus

1	Éliminer la cartouche utilisée.	
2	Récupérer le reste de l'échantillon. Si le volume résiduel de l'échantillon est insuffisant, ou si la répétition du test donne un résultat NON VALIDE , ERREUR , ou PAS DE RÉSULTAT , prélever un nouvel échantillon.	
3	Répéter le test avec une nouvelle cartouche et un nouveau réactif d'échantillon.	
4	Suivre les instructions de la notice pour la réalisation du test.	

Facteurs affectant négativement les résultats

- **Prélèvement incorrect de l'échantillon**
 - Les performances du test n'ont pas été évaluées avec d'autres dispositifs de prélèvement et d'autres types d'échantillon.
 - Pour les tests contenant le contrôle 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.
 - Se reporter à la notice pour les instructions de manipulation appropriées.
- **Procédure de test incorrecte**
 - Une modification des procédures de test peut altérer les performances du test.
 - Une erreur technique ou une confusion d'échantillon peut affecter les résultats du test.
 - Il est nécessaire de bien respecter la notice pour éviter des résultats erronés.
- **Substance interférente**
 - La présence d'une substance interférente peut entraîner des résultats faux négatifs ou des résultats non valides.
- **Le nombre de micro-organismes dans échantillon est inférieur au seuil de détection du test**
- **Se reporter à la notice pour le taux de résultats indéterminés**

Substances interférentes

- **Une interférence avec le test peut être observée en présence de :**
 - **Benzalkonium** (lingettes antiseptiques) **en concentration supérieure ou égale à 0,2 % p/v**
 - **Bismuth** à **une concentration supérieure à 5 % p/v**
- **Se reporter à la notice Xpert Norovirus pour des informations sur les substances interférentes.**

Débat et questions-réponses



 **Cepheid**[®]
A better way.

Assistance technique

- **Cepheid assure une assistance technique sur site, par téléphone, par fax et par e-mail.**
- **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 5 63 82 53 19**
 - Allemagne : + 49 69 710 480 480**
 - Royaume-Uni : + 44 3303 332533**
 - Afrique du Sud : +27 11 234 9636**
 - Australie, Nouvelle-Zélande : +61 1800 107 884**
 - **Fax : +33 563 82 53 01**
 - **E-mail : support@cepheideurope.com**

Débat et questions-réponses

