

Assay-Schulung: Xpert[®] Carba-R

Technischer Kundendienst von Cepheid
CE-IVD



 **Cepheid**[®]
A better way.

Schulungsprogramm

- **Xpert Carba-R Schulung**
 - Reagenzien
 - Probenentnahme
 - Lagerung und Handhabung der Kits
 - Vorsichtsmaßnahmen
 - Vorbereitung der Kartusche
- **Qualitätskontrolle**
- **Ergebnisanalyse**
- **Diskussion und Fragen**



Ziele der Xpert Carba-R Schulung

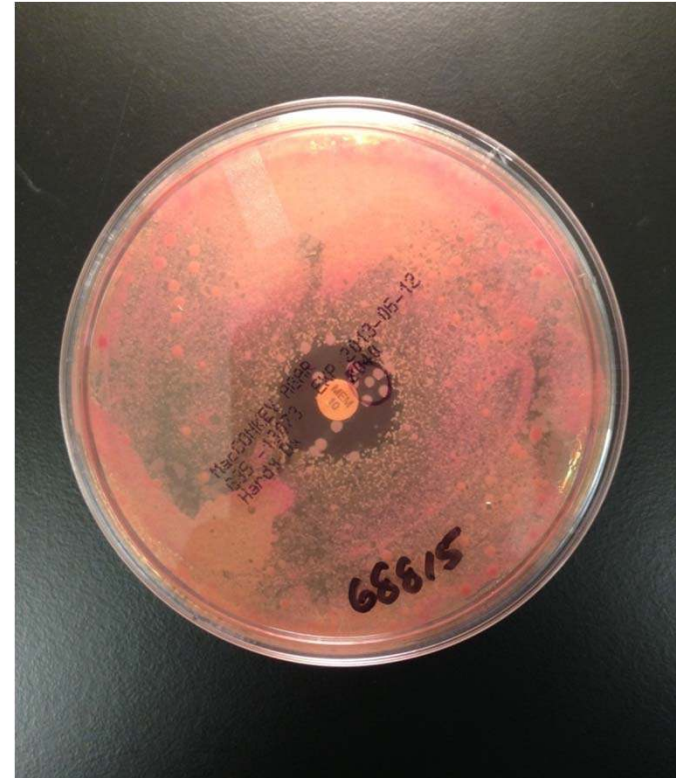
Am Ende der Schulung haben die Anwender folgende Kenntnisse erworben:

- **Sachgemäße Lagerung und Handhabung der Xpert Carba-R Kartuschenkits**
- **Korrekte Befolgung der Vorsichtsmaßnahmen zur Sicherheit im Labor**
- **Entnahme geeigneter Probenotypen und Transport von Patientenproben**
- **Vorbereitung der Kartusche und Durchführung des Assays**
- **Weitergabe der verschiedenen von der Software ausgegebenen Ergebnisse**
- **Verständnis der Assay-Kontrollstrategie**

Vorstellung des Krankheitsbilds

Was ist Carbapenem-Resistenz (Carba-R)?

- Carbapeneme sind eine Klasse von β -Lactam-Antibiotika, die häufig als Reserveantibiotika eingesetzt werden.
 - Carbapenem-Resistenz oder kurz Carba-R ist das Ergebnis von chromosomalen und hoch mobilen plasmidvermittelten Resistenzgenen, die mit gramnegativen enteralen Organismen, Pseudomonas- und Acinetobacter-Keimen assoziiert sind.
 - Infektionen mit Carbapenem-resistenten Organismen gehen mit einer hohen Mortalität (bis zu 40-50%) einher.¹
 - Das Screening auf befallene Patienten kann Maßnahmen zur Infektionskontrolle beschleunigen und die Wahrscheinlichkeit einer nosokomialen Ausbreitung senken.



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

Die Lösung von Cepheid



- **Simultane Detektion und Differenzierung**
 - Fünf Carba-R-Gen-Zielsequenzen
 - Zwei interne Kontrollen für jede einzelne Probe
 - Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC)
 - Sondenprüfungskontrolle (Probe Check Control, PCC)
- **Hohe Sensitivität und Spezifität**
- **Unkomplizierte Anwendung**
 - Geschlossenes Kartuschensystem
- **Ergebnisse in 48 Minuten**
- **Bedarfsbasierte Ergebnisse rund um die Uhr**
- **Wahlfreier Zugriff**

Verwendungszweck

Der auf den GeneXpert® Instrumentensystemen durchgeführte Cepheid Xpert Carba-R Assay ist ein qualitativer *In-vitro*-Diagnostiktest für den **schnellen Nachweis** und zur **Differenzierung** der mit **Carbapenem-Resistenz** assoziierten **Gene**sequenzen bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} und bla_{IMP-1} in gramnegativen Bakterien aus rektalen Abstrichproben von Patienten, bei denen ein Risiko für die **Besiedlung des Darms** durch Carbapenem-resistente Bakterien besteht. Der Test basiert auf der automatisierten Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Der Xpert Carba-R Assay ist zur Verwendung als Hilfsmittel für den Nachweis von Carbapenem-resistenten Bakterien bestimmt, die Patienten in einem Krankenhaus oder einer Pflegeeinrichtung befallen. Der Xpert Carba-R Assay ist nicht zur Leitung oder Überwachung der Behandlung von Carbapenem-resistenten bakteriellen Infektionen vorgesehen.

Es müssen gleichzeitig Kulturen angelegt werden, um Organismen für die epidemiologische Typisierung, antimikrobielle Empfindlichkeitstests und die zusätzliche bestätigende Identifizierung der Carbapenem-resistenten Bakterien zu gewinnen.

Anforderungen an System und Reagenzien

GeneXpert Systeme

- **Module mit 6 Farben**
- **GX DX Software v4.3 oder höher**

Testkits (CE-IVD)

- **GXCARBAR-CE-10**

Probenentnahmekits

- **Cepheid Bestellnummer 900-0370**

Xpert Carba-R Kit

	Xpert Carba-R Assay
Bestellnummer	GXCARBAR-CE-10
Tests pro Kit	10
Inhalt pro Testkartusche	Trockene und flüssige Reagenzien
Transferpipetten	10
Fläschchen mit Probenreagenz	10
Lagerung	2 °C – 28 °C



Entnahme, Transport und Lagerung von Proben für den Xpert Carba-R Assay



Cepheid Probenentnahmetupfer
(Teile-Nummer 900-0370)

SOLLBRUCHS
TELLE

- **Probentyp:**
 - **Rektaler Abstrich**
- **Probenentnahme:**
 - **Zur Entnahme einer gepaarten rektalen Abstrichprobe beide Tupferspitzen vorsichtig etwa 1 cm über den Afterschließmuskel hinaus einführen und behutsam drehen.**
- **Transport und Aufbewahrung von Proben:**
 - **Unmittelbar nach der Entnahme kann der Abstrich bis zu 6 Stunden bei 15 °C – 28 °C aufbewahrt werden. Anschließend kann der Tupfer bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 28 °C gelagert werden.**

Probenentnahme

Protokoll für die Entnahme von rektalen Proben

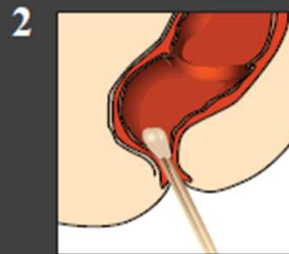
GeneXpert®

Zur Verwendung mit den Xpert® Assays:

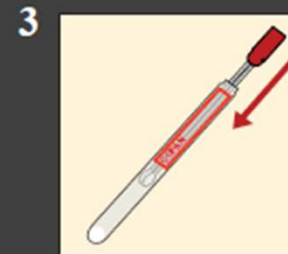
- Xpert Carba-R



Die Probe muss mit einem Copan Venturi Transystem Doppeltupfer entnommen werden. Cepheid Probenentnahmetupfer Nr. 900-0370



Beide Tupferspitzen vorsichtig etwa 1 cm über den Afterschließmuskel hinaus einführen und behutsam drehen.



Die Tupfer wieder in das Röhrchen stecken.



Proben, die innerhalb von 8 Stunden getestet werden können, können bei 15 °C – 28 °C gelagert werden. Bei 2 °C – 28 °C gelagerte Proben sind bis zu 7 Tage stabil.

Führend in der *bedarfsbasierten* molekularen Diagnostik

 **Cepheid.**
Bring answers to life.

301-3343G Rev A, Juni 2014

© 2014 Cepheid

Gute Laborpraxis

Einrichtung des PCR-Labors

- Vorbereitung von Kartuschen/Reagenzien → Zugabe der Probe → Detektion

Aufbewahrung von Proben und Reagenzien

- Zur Vermeidung von Kontaminationen der Reagenzien müssen Patientenproben von Reagenzien getrennt aufbewahrt werden.

Ausrüstung

- Falls nötig, für QK-Verdünnungen Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Die Empfehlungen des Herstellers zur Kalibrierung und Wartung der Laborgeräte befolgen.

Gute Laborpraxis, Forts.

Sauberkeit

- Arbeitsflächen zuerst mit verdünnter Haushaltsbleiche bei einer Endkonzentration von 1:10 und anschließend mit einer 70%igen Ethanol- oder 70%igen Isopropanollösung reinigen. Die Arbeitsflächen zum Trocknen abwischen.
- Bei Kontaminationen den betroffenen Bereich mit 1:10 verdünnter Haushaltsbleiche, DNA AWAY oder 3 Gew.-% Wasserstoffperoxid reinigen und gründlich mit Wasser nachspülen. Die Arbeitsflächen zum Trocknen abwischen.

Personal

- Saubere Laborkittel und Handschuhe verwenden.
- Nach der Bearbeitung jeder einzelnen Probe die Handschuhe wechseln.

Labortischbereich

- Der Labortischbereich muss regelmäßig gereinigt werden.
- Die Rückseite des Instruments regelmäßig abstauben.

Aufbewahrung und Handhabung des Xpert Carba-R Kits



- Testkits bei 2 °C – 28 °C aufbewahren. Keine abgelaufenen Kartuschen verwenden.
- Jede Einweg-Kartusche dient zur Durchführung eines einzigen Tests. Verbrauchte Kartuschen nicht wiederverwenden.
- Die Kartusche erst öffnen, wenn die aus dem Tupfer eluierte Probe bereit zur Zugabe ist.
 - Die Kartusche sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Probe in das Instrument gestellt werden.
- Beim Umgang mit den Proben Kreuzkontaminationen vermeiden.
 - Nach der Bearbeitung jeder einzelnen Probe die Handschuhe wechseln.
 - Die Handschuhe sind beim Verlassen bzw. Betreten des Arbeitsbereichs zu wechseln.
- Keine Kartuschen verwenden, die nach der Entnahme aus der Verpackung fallen gelassen wurden.
- Die Kartusche nicht schütteln. Wenn die Kartusche nach dem Öffnen des Kartuschendeckels geschüttelt oder fallen gelassen wird, sind die Ergebnisse möglicherweise ungültig.
- Kartuschen mit beschädigtem Reaktionsbehälter dürfen nicht verwendet werden.

Vorbereitung der Xpert Carba-R Kartusche

Vorbereitung der Xpert® Kartusche - Carba-R

Ausführliche Anleitung, Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise sind der Packungsbeilage zu entnehmen.

Ein Exemplar des Sicherheitsdatenblatts ist auf www.cepheid.com oder www.cepheidinternational.com abrufbar

Technischer Kundendienst von Cepheid

Büro USA
(888) 838-3222

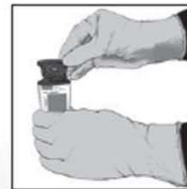
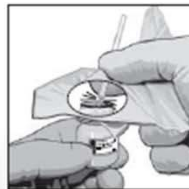
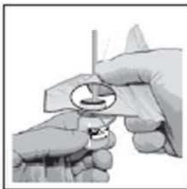
techsupport@cepheid.com

Büro Europa
+33 563 82 53 19

support@cepheideurope.com



- 1 Für jede Probe eine Xpert Kartusche und ein Fläschchen mit Probenreagenz besorgen.
- 2 Den Tupfer in das Fläschchen mit Probenreagenz stecken.
- 3 Den Tupfer an der Sollbruchstelle nahe der Fläschchen-Öffnung abbrechen.
- 4 Das Fläschchen mit Probenreagenz wieder verschließen und 10 Sekunden lang vortexen.
- 5 Den Xpert Kartuschendeckel öffnen.
- 6 Probenreagenz bis zur Linie in die mitgelieferte Pipette aufziehen.
- 7 Die Pipette in die Probenkammer entleeren.
- 8 Den Xpert Kartuschendeckel schließen.
- 9 Den Test innerhalb des in der Packungsbeilage angegebenen Zeitrahmens starten.



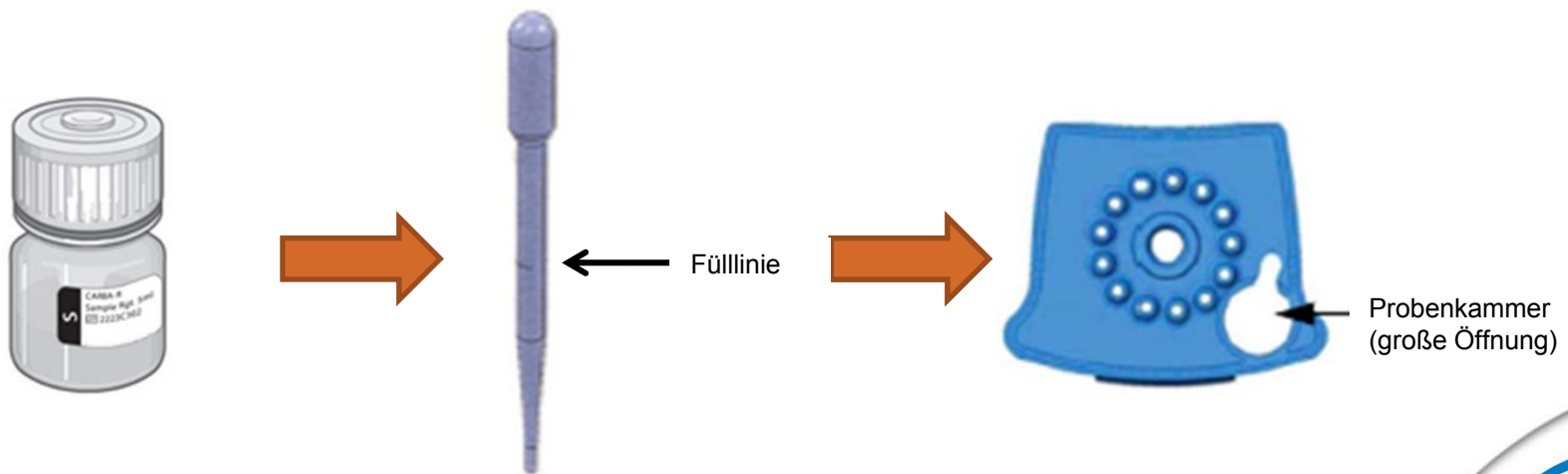
Hinweis: Den Tupfer nicht unterhalb der Sollbruchstelle festhalten. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos Gaze oder Ähnliches verwenden.

© 2014 Cepheid

301-3292G Rev. A Juli 2014

Durchführung des Tests

- Einen einzelnen Tupfer in das Fläschchen mit Probenreagenz stecken; an der Sollbruchstelle abbrechen. Dabei sterile Gaze verwenden, um das Kontaminationsrisiko zu senken.
 - Den nicht benutzten Tupfer in den Transportbehälter stecken und bei 2 °C – 28 °C lagern.
- Das Probenreagenzfläschchen 10 Sekunden lang bei hoher Drehzahl im Vortex mischen.
- Das Probenreagenzfläschchen öffnen.
- Die Transferpipette bis zur Markierung füllen.
 - Sicherstellen, dass keine Luftblasen enthalten sind.
 - Das restliche Probenmaterial im Probenreagenzfläschchen kann für einen eventuell erforderlichen Wiederholungstest bis zu 4 Tage bei 2 °C – 28 °C aufbewahrt werden.



Durchführung des Tests



Qualitätskontrolle

Weitere Einzelheiten sind der
Packungsbeilage zu entnehmen



 **Cepheid**[®]
A better way.

Die Assay-Kontrollstrategie von Cepheid

- **Jede Xpert-Kartusche ist eine abgeschlossene Testeinheit.**
 - **Cepheid hat spezielle molekulare Methoden entwickelt, um interne Kontrollen ins Verfahren aufzunehmen, mit denen das System in jeder Kartusche bestimmte Fehlermodi erkennen kann.**
 - **Instrumentensystemkontrolle: Status prüfen**
 - **Reagenzienkontrolle: Sondenprüfung**
 - **Probenbearbeitungskontrolle: SPC und/oder SAC**
 - **Amplifikationskontrolle: SPC und/oder SAC und/oder IC**

Instrumentensystemkontrolle – Status prüfen

- Die Systemkontrolle des Instruments überprüft die Optik, die Temperatur des Moduls und die mechanische Integrität der einzelnen Kartuschen.
 - Schlagen die Systemkontrollen fehl, wird als Testergebnis **FEHLER** ausgegeben.

Reagenzienkontrolle - Sondenprüfungskontrolle

- Nach der Vorbereitung der Probe, der Rekonstitution der Kügelchen und der Füllung des Reaktionsbehälters (vor dem Wärmezyklus) werden bei verschiedenen Temperaturen mehrere Fluoreszenz-Messwerte erfasst.
- Die Messwerte werden mit den von Cepheid festgelegten Standardeinstellungen verglichen.
- Die Sondenprüfung erkennt:
 - fehlende Kügelchen für Target-spezifische Reagenzien (Target Specific Reagent, TSR) und/oder Enzymreagenzien, die alle Primer, Sonden und die Vorlage für die internen Kontrollen enthalten
 - die unvollständige Rekonstitution von Reagenzien
 - nicht ausreichend gefüllte Reaktionsbehälter
 - Sondenverderb
- Schlägt die Sondenprüfung fehl, wird als Testergebnis FEHLER ausgegeben.

Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC)

- Die Probenbearbeitungskontrolle (SPC) beurteilt die Wirksamkeit der Probenbearbeitungsschritte einschließlich der Füllung des Reaktionsbehälters.
- Die SPC besteht aus Sporen von *Bacillus globigii*.
- Die SPC erkennt:
 - fehlender Primer/fehlende Sonde oder fehlende Enzymkügelchen
 - die unvollständige Rekonstitution von Reagenzien
 - nicht ausreichend gefüllte Reaktionsbehälter
 - Enzymverderb
 - Probenlyse, Nukleinsäureextraktion und Integrität der Nukleinsäure
 - Probenhemmung
- Die SPC kann in einer Analyt-positiven Probe negativ oder positiv sein.
- Sollte die SPC in einer Analyt-negativen Probe fehlschlagen, wird als Testergebnis **UNGÜLTIG** ausgegeben.

Handelsübliche externe Kontrollen

Organismen- name	Gefundene Beta-Lactamasen	Quelle
<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

- **Andere Optionen:**
 - Bekannte positive und negative Patientenproben

Ergebnisanalyse

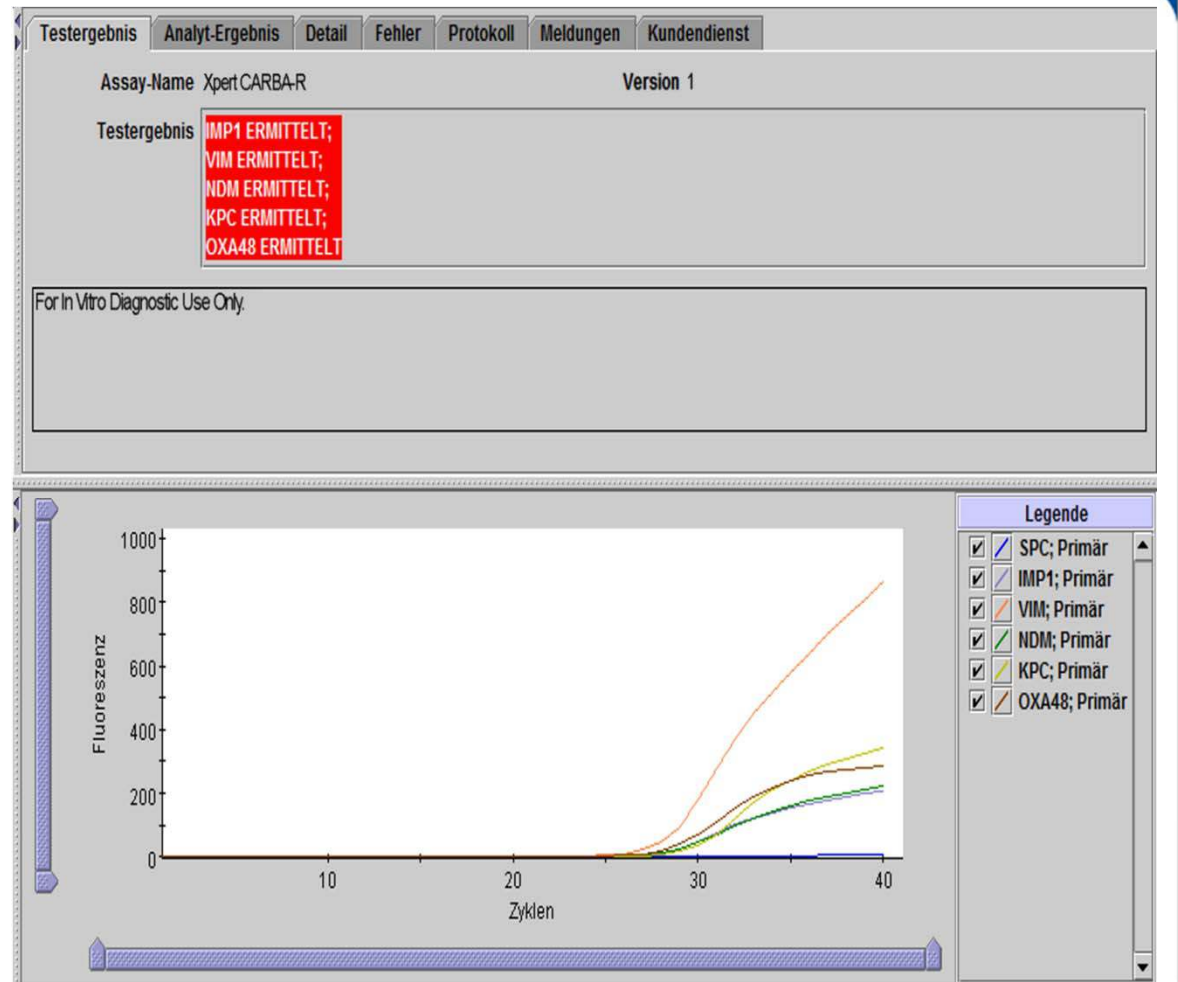
Weitere Einzelheiten sind der
Packungsbeilage zu entnehmen



 **Cepheid**[®]
A better way.

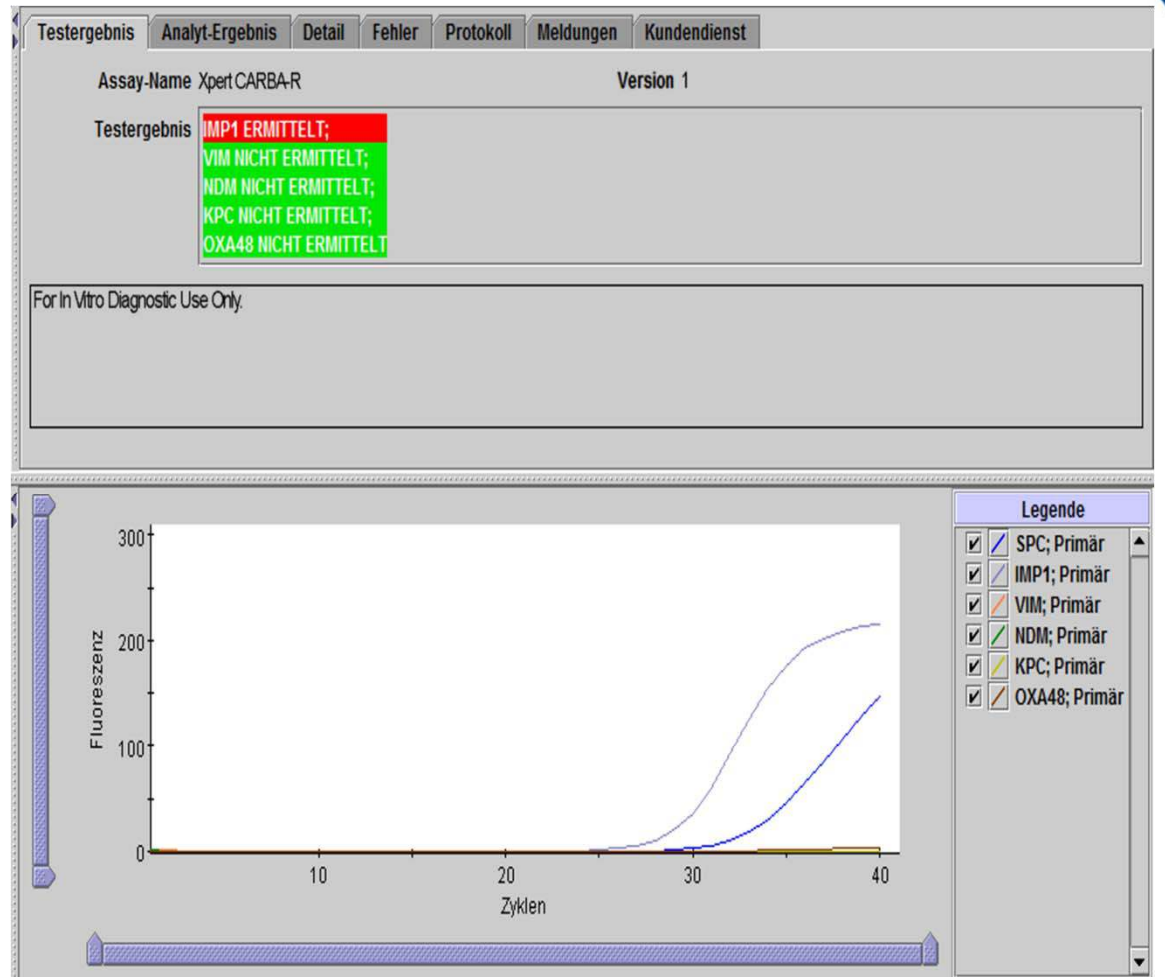
Ergebnisse des Xpert Carba-R Assays: IMP1 Pos/ VIM Pos/ NDM Pos/ KPC Pos/ OXA48 Pos

- Die Ziel-DNA-Sequenzen IMP1, VIM, NDM, KPC und OXA48 wurden nachgewiesen.
- SPC: Nicht zutreffend. Die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation von IMP1-, VIM-, NDM-, KPC- und OXA48-Ziel-DNA mit dieser Kontrolle konkurrieren kann.
- Sondenprüfung: BEST. Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.



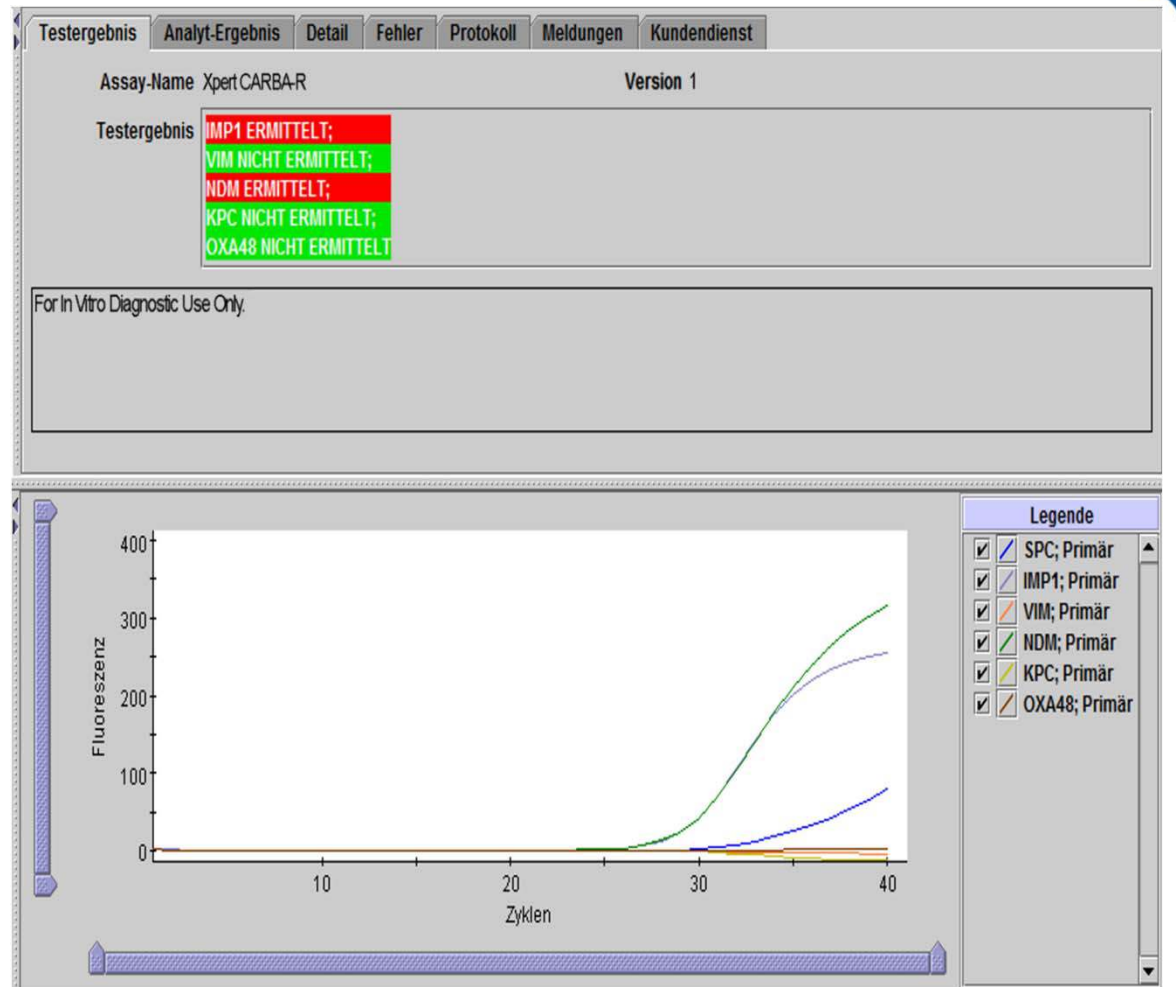
Ergebnisse des Xpert Carba-R Assays: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Die Ziel-DNA-Sequenz IMP1 wurde nachgewiesen. Die Ziel-DNA-Sequenzen VIM, NDM, KPC und OXA48 wurden nicht nachgewiesen.
- SPC: Nicht zutreffend. Die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation von IMP1-Ziel-DNA mit dieser Kontrolle konkurrieren kann.
- Sondenprüfung: BEST. Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.



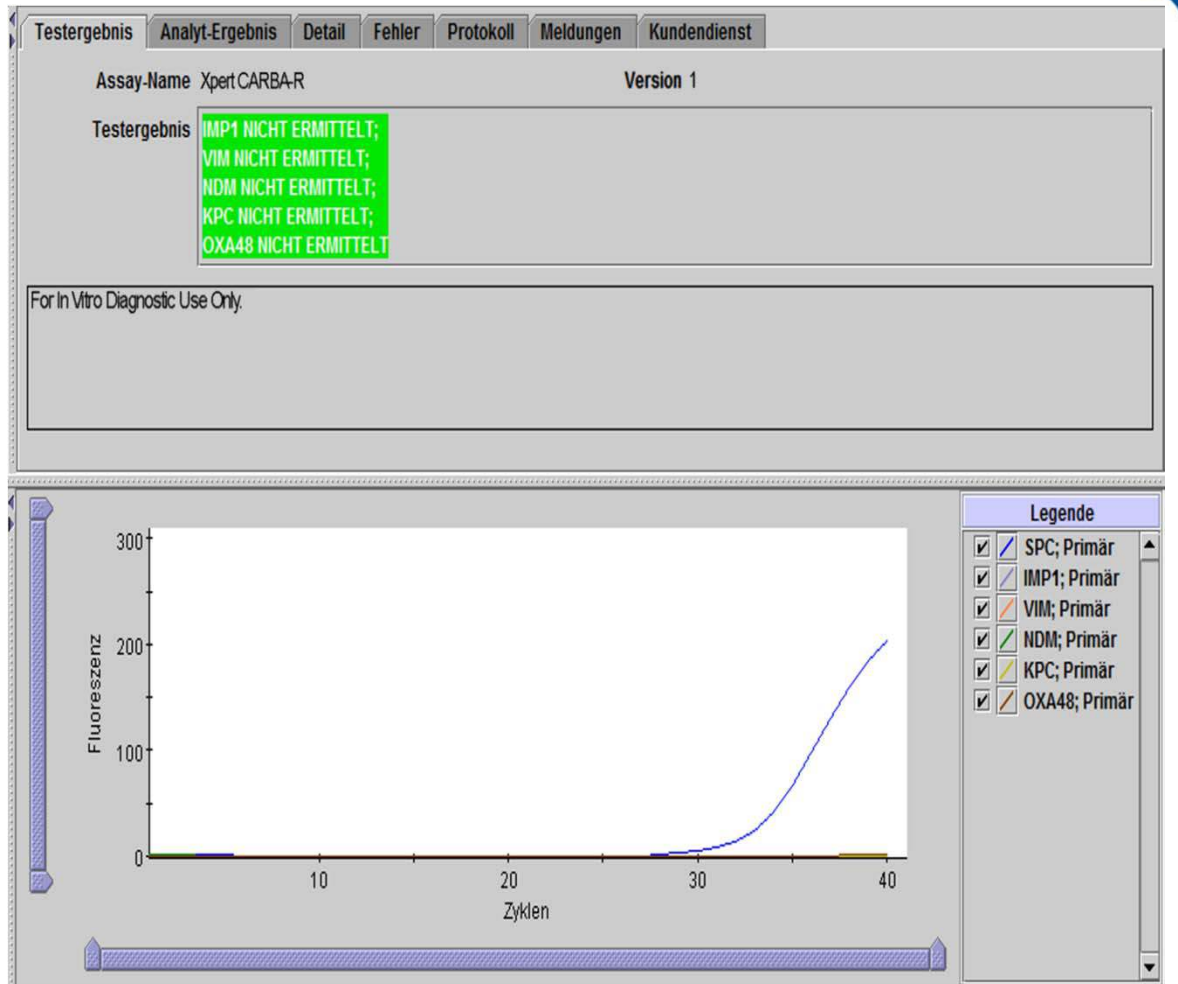
Ergebnisse des Xpert Carba-R Assays: IMP1 Pos/ VIM Neg/ NDM Pos/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Die Ziel-DNA-Sequenzen IMP1 und NDM wurden nachgewiesen. Die Ziel-DNA-Sequenzen VIM, KPC und OXA48 wurden nicht nachgewiesen.
- SPC: Nicht zutreffend. Die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation von IMP1- und NDM-Ziel-DNA mit dieser Kontrolle konkurrieren kann.
- Sondenprüfung: BEST. Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.



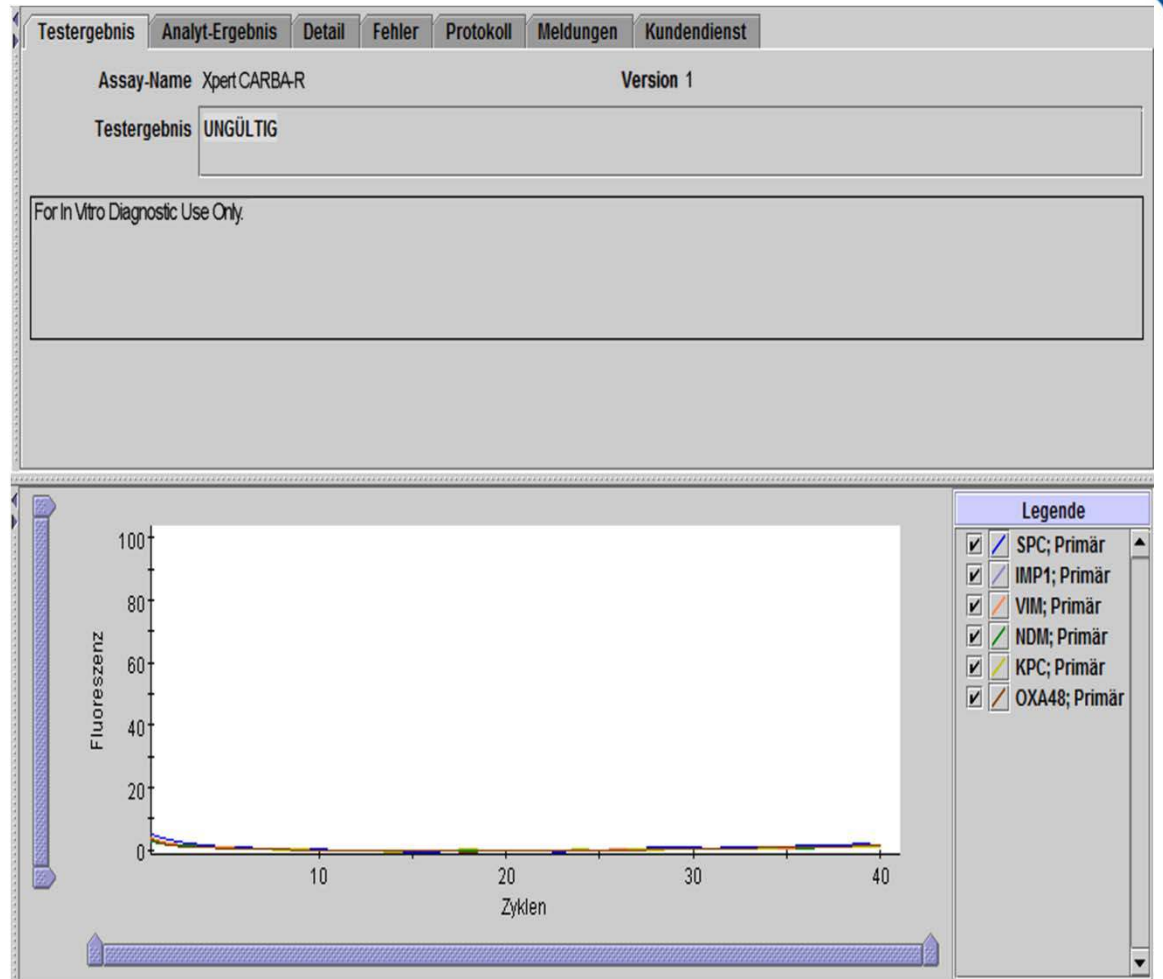
Ergebnisse des Xpert Carba-R Assays: IMP1 Neg/ VIM Neg/ NDM Neg/ KPC Neg/ OXA48 Neg

- Die Ziel-DNA-Sequenzen IMP1, VIM, NDM, KPC und OXA48 wurden nicht nachgewiesen.
- SPC: BEST.; die PCR-Amplifikation der SPC-DNA-Sequenz ergibt einen Ct-Wert innerhalb des gültigen Bereichs und einen Fluoreszenzendpoint oberhalb des eingestellten Minimums.
- Sondenprüfung: BEST. Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.



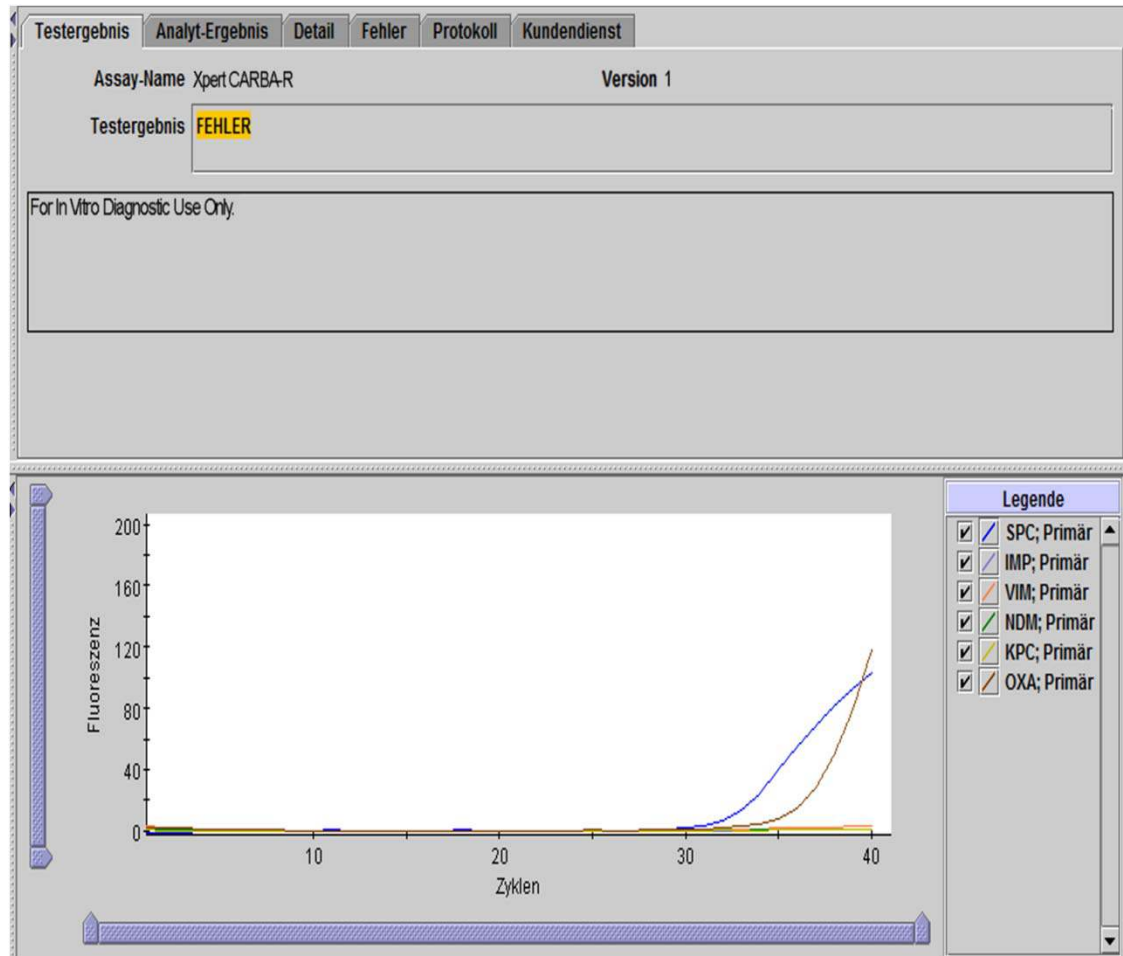
Ergebnisse des Xpert Carba-R Assays: UNGÜLTIG

- Das Vorliegen bzw. Nichtvorliegen der Ziel-DNA-Sequenzen IMP1, VIM, NDM, KPC und OXA48 kann nicht bestimmt werden.
- SPC: DEFEKT; keine PCR-Amplifikation der SPC-DNA-Sequenz oder der SPC-Ct-Wert liegt nicht innerhalb des gültigen Bereichs und der Fluoreszenzendpunkt liegt unterhalb des eingestellten Minimums.
- PCC: BEST.; alle Sondenprüfungsergebnisse waren erfolgreich.



Ergebnis des Xpert Carba-R Assays: FEHLER

- Das Vorliegen bzw. Nichtvorliegen der Ziel-DNA-Sequenzen IMP1, VIM, NDM, KPC und OXA48 kann nicht bestimmt werden.
 - SPC: KEIN ERGEBNIS
 - PCC: DEFEKT*; ein oder alle Sondenprüfungs-ergebnisse waren nicht erfolgreich. Die PCC ist wahrscheinlich fehlgeschlagen, weil der Reaktionsbehälter unsachgemäß gefüllt wurde oder ein Problem mit der Unversehrtheit einer Sonde festgestellt wurde.
- * Bei erfolgreicher Sondenprüfung geht der Fehler auf den Ausfall einer Systemkomponente zurück.



Ergebnis des Xpert Carba-R Assays: KEIN ERGEBNIS

- Vorliegen oder Abwesenheit der DNA-Zielsequenzen für Carba-R ist nicht zu bestimmen. Den Test gemäß den Anweisungen in Abschnitt 13 der Packungsbeilage, **Testwiederholung**, wiederholen. Es wurden nicht genügend Daten gesammelt, um ein Testergebnis zu erzielen (zum Beispiel hat der Benutzer einen laufenden Test abgebrochen).
- SPC: KEIN ERGEBNIS
- PCC: Nicht zutreffend

Gründe für eine Wiederholung des Assays

- Das Ergebnis **UNGÜLTIG** bedeutet, dass die Probenbearbeitungskontrolle (SPC) fehlgeschlagen ist. Die Probe wurde nicht sachgemäß bearbeitet oder die PCR wurde gehemmt.
- Das Ergebnis **FEHLER** bedeutet, dass die Sondenprüfungskontrolle fehlgeschlagen ist und der Assay abgebrochen wurde. Mögliche Ursachen: unzureichende Füllung des Reaktionsbehälters, Problem mit der Unversehrtheit der Sonden oder Überschreitung der maximalen Druckgrenzwerte.
- **KEIN ERGEBNIS** bedeutet, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise könnte der Bediener den Test abgebrochen haben, bevor er abgeschlossen war.






Faktoren mit negativem Einfluss auf die Ergebnisse

- **Unsachgemäße Probenentnahme**
 - Die Leistung des Tests unter Verwendung anderer Probenentnahmeprodukte und Probentypen wurde nicht beurteilt.
 - Bei Assays, die die SAC-Kontrolle enthalten, ergibt eine Probe ohne humane Zellen ein ungültiges Testergebnis.
- **Unsachgemäßer Transport oder unsachgemäße Aufbewahrung der entnommenen Patientenprobe**
 - Die Aufbewahrungs- und Transportbedingungen sind probenspezifisch.
 - Anweisungen zur sachgemäßen Handhabung sind der Packungsbeilage zu entnehmen.
- **Unsachgemäßes Testverfahren**
 - Änderungen an den Testverfahren können die Leistung des Tests beeinträchtigen.
 - Technische Fehler oder Probenverwechslung können die Testergebnisse beeinträchtigen.
 - Die Packungsbeilage ist sorgfältig zu befolgen, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- **Störsubstanzen**
 - Bei Vorliegen von Störsubstanzen kann es zu falsch negativen Testergebnissen oder ungültigen Ergebnissen kommen.
- **Anzahl der Organismen in der Probe liegt unterhalb der Nachweisgrenze des Tests**
- **Die Quote der unbestimmten Proben ist der Packungsbeilage zu entnehmen**

Störsubstanzen

- **Von den 23 getesteten, potenziell hemmenden Substanzen hatte Pepto-Bismol (Wismutsubsalylylat) bei 0,25 Gew.-% eine statistisch signifikante hemmende Wirkung auf den Nachweis von IMP-1 im Xpert Carba-R Assay. Andere statistisch signifikante hemmende Wirkungen wurden nicht beobachtet.**
- **Weitere Angaben zu potenziell hemmenden Substanzen bitte der Packungsbeilage für den Xpert Carba-R Assay entnehmen.**

Wiederholung des Carba-R-Tests

1	Die gebrauchte Kartusche entsorgen.	
2	Die folgenden neuen Artikel aus dem Testkit entnehmen: Xpert Carba-R Kartusche, Probenreagenzfläschchen und Transferpipette.	
3	Die verbleibende Flüssigkeit aus dem ursprünglichen (≤ 4 Tage bei 2 °C – 8 °C gelagerten) Probenreagenzfläschchen in das neue Probenreagenzfläschchen transferieren.	
4	Den Test mit einer neuen Kartusche wiederholen.	
5	Die Anleitung zur Durchführung von Tests in der Packungsbeilage befolgen.	

Diskussion und Fragen



 **Cepheid®**
A better way.

Technischer Kundendienst

- **Cepheid bietet technischen Kundendienst vor Ort, am Telefon, per Fax und per E-Mail.**
- **Nordamerika:**
 - **Telefon: +1 (888) 838-3222**
 - **Fax: +1 (408) 716-2550**
 - **E-Mail: techsupport@cepheid.com**
- **Europa, Afrika, Naher Osten, indischer Subkontinent:**
 - **Telefon:**
 - Frankreich: +33 563 825 319**
 - Deutschland: +49 69 710 480 480**
 - Großbritannien: +44 3303 332 533**
 - Südafrika: +27 11 234 9636**
 - Australien, Neuseeland: +61 1800 107 884**
 - Andere Länder in Europa, im Nahen Osten und in Afrika: +971 4 253 3218**
 - **Fax: +33 563 825 301**
 - **E-Mail: support@cepheideurope.com**

Diskussion und Fragen

