



Utilisation de l'appareil de PCR en temps réel LightCycler 480II de Roche

Auteur(s) : Cynthia Massé

Réviser(s) : Marc-Christian Domingo

Approbateur : Marc-Christian Domingo (Responsable scientifique)

Coordonnateur du document : Mélanie Pilote

Ébauche

I. PRÉAMBULE

Ce document est une nouvelle procédure.

II. OBJET

Ce document vise à fournir l'essentiel des informations nécessaires au paramétrage du logiciel, à la configuration d'un essai, à la production d'un rapport d'analyse et à l'entretien et la calibration de l'appareil.

III. CHAMPS D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel ayant à réaliser des analyses sur l'appareil de PCR en temps réel LC480 II de Roche.

IV. DÉFINITION DES TERMES

N/A

V. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

A) Principe

Le LightCycler 480 II de Roche est un appareil de PCR en temps réel offrant différentes chimies pour la détection de gène, l'analyse d'expression de gène et de variations génétiques.

Ses différents formats de détection variant entre 440-618 nm pour l'excitation et 488-660 nm pour l'émission des fluorophores permettent de détecter simultanément jusqu'à 6 cibles différentes dans un même puits.

Les différents formats de détections sont :

Canal	500	530	580	610	640	660	700
Fluorophores calibrés	Cyan 500	FAM	R6G YAK	LC610	LC640	LC660	LC705
Fluorophores compatibles	-	-	HEX JOE VIC	ROX Texas Red	-	Cy5 Atto647	Cy5.5
Excitation/émission	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660	618-660

Puisque l'appareil permet de sélectionner une combinaison d'ondes excitation/émission (et non un fluorophore précis pré-calibré), l'appareil est en principe compatible avec tous les fluorophores sur le marché qui peuvent être détectés sous les différents canaux offerts par l'appareil.

Les fluorophores qui sont calibrés dans leur canal approprié ou compatibles avec la compensation de couleur offerte par la compagnie sont inscrits dans le tableau ci-haut; par contre, si le fluorophore sélectionné ne fait pas partie de l'ensemble de compensation de couleur de Roche ou n'est pas inscrit comme compatible, il est recommandé de calibrer le fluorophore et faire une compensation de couleur maison afin d'obtenir de meilleurs résultats pour les fins d'analyse.

À noter que si la chimie SYBR green est utilisé (pour la détection générale de produits PCR), la détection doit se faire dans le canal 530.

L'appareil permet l'utilisation de paramètres de cyclages standards ou rapides.

B) Entreposage

L'appareil doit être localisé dans une pièce dont la température ambiante se situe entre 15°C et 32°C et le taux d'humidité se situe entre 30 et 80%. Il ne doit pas être situé près de systèmes de chauffage ou de refroidissement ni exposé à la lumière du soleil. Il ne doit pas être installé sur le même comptoir que des instruments générant des vibrations, tels que des centrifugeuses ou des pompes. Afin de permettre un refroidissement et un accès adéquat à l'appareil, laisser un minimum de 6 pouces d'espacement autour de l'appareil.

C) Maintenance

Le LightCycler 480 II ne requiert aucune maintenance particulière, ni par le fabricant, ni par le propriétaire :

- Au besoin, nettoyer l'extérieur de l'appareil avec un chiffon imbibé d'alcool.
- Si nécessaire, il est possible de nettoyer le « thermal block cycler » et le « block cycler cover » avec un chiffon à l'alcool en évitant de toucher aux composantes électroniques.
Pour nettoyer le « thermal block unit », pipetter 125 µl d'alcool 70%, laisser agir 15 minutes et ensuite faire des « up and down » à l'aide d'une multi-pipette; enlever tout l'alcool et laisser sécher jusqu'à évaporation complète avant de remettre dans l'appareil.

- La lampe au xénon de l'appareil doit être changée lorsque son intensité diminue de plus de 50%; dans ce cas, le logiciel de l'appareil émettra un avertissement de changement de la lampe.
Lors du changement : éteindre l'appareil minimum 20 minutes précédant le changement et débrancher le câble d'alimentation. Porter des équipements de protection (sarrau, gants, lunettes, et protéger le cou avec un équipement approprié) car même si le risque est très minime, il existe un danger d'explosion de la lampe dû à la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la lampe. S'assurer que le nouveau bulbe est propre et qu'aucune trace de saleté n'est présente; dans le cas contraire, nettoyer le bulbe doucement avec un chiffon sans charpie imbibé d'alcool. Se référer au manuel d'utilisateur pour les étapes à suivre pour le changement.
Disposer du vieux bulbe au secteur Physico-chimie ou en disposer de la façon suivante : envelopper le bulbe dans un linge épais; casser le bulbe et disposer dans une poubelle (le bulbe ne contient aucune matière dangereuse pour l'environnement).
- Une fois par an, les deux filtres à poussière de l'appareil doivent être changés (Cat. No. 04686128001)
- Au besoin, changer les fusibles en fin de vie; se référer au manuel d'utilisateur pour les étapes à suivre pour le changement.

D) Calibration

L'appareil ne requiert aucune calibration de ses composantes (ex. bloc chauffant).

Une calibration des fluorophores (compensation de couleur) doit être effectuée une fois lors de l'installation de l'appareil avec la trousse « LightMix Universal Color Compensation Hexaplex^{Plus} » de TIB MOLBIOL. Pour effectuer la calibration, suivre les étapes dans l'encart fourni dans l'ensemble de compensation de couleur Hexaplex.

Rappel : Il est recommandé de faire une calibration « maison » lorsque des fluorophores autres que ceux cités dans le tableau ci-haut sont utilisés. Pour effectuer une calibration « maison », suivre les mêmes étapes de la calibration de base.

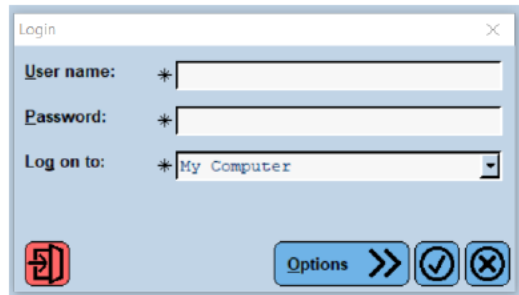
E) Démarrage de l'appareil

- Appuyer sur le bouton de démarrage de l'appareil;

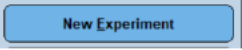




- Démarrer l'ordinateur et ouvrir le logiciel

- Inscrire le nom d'utilisateur : [REDACTED] et le mot de passe : [REDACTED]



F) Créer un « template »

- 1) Cliquer sur «  »
- 2) Dans l'onglet « **Run protocol** » et la fenêtre « **Setup** » :
 - Choisir le format de détection désiré; **pour créer et enregistrer un format de détection, voir le point J;**
 - Inscrire le volume de réaction;
- 3) Dans la fenêtre « **Program** », cliquer sur le  pour ajouter le nombre d'étapes PCR nécessaires (pour enlever des étapes, cliquer sur le );
- 4) Remplir les champs « **Program name** », « **Cycles** », et « **Analysis mode** »,
- 5) Dans la fenêtre « **Amplification temperature targets** », inscrire la température désirée, le mode d'acquisition, la durée et « ramp rate » pour chaque étape, et ce en sélectionnant préalablement une à la fois l'étape en question dans la fenêtre « **Program Name** »;
- 6) Cliquer sur le menu déroulant « **Apply template** » et sélectionner « Save as template »; enregistrer dans le dossier sous: XXXXXXX

Une fois enregistré, ce « template » pourra être sélectionné dans la page principale du logiciel en cliquant sur «  lors d'une prochaine « run ».

Il est possible de modifier un « template », mais si les changements doivent être enregistrés, il faudra enregistrer le nouveau « template » sous un nouveau nom de fichier.

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62
Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected
Database: My Computer (Research)
User: System Admin

Window: New Experiment

Experiment: Setup

Detection Format: 4 Color Hydrolysis Probe

Color Comp ID: Lot No: Test ID: Reaction Volume: 20

Program Name	Cycles	Analysis Mode
RT	1	None
Denaturation	1	None
Amplification	45	Quantification
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4,4	0	0	0	0
60	Single	00:00:15	2,2	0	0	0	0
72	None	00:00:15	4,4	0	0	0	0

Overview

Temperature (°C) vs Estimated Time (h:mm:ss)

Apply Template

End Program + 10 Cycles Start Run

G) Créer la feuille de travail

- 1) Dans le menu de gauche, cliquer sur « Subset Editor »;
- 2) Cliquer sur le et nommer le nouveau « Subset »;
- 3) Sélectionner les puits qui seront analysés et cliquer sur « Apply »;

N.B. Pour ajouter ou enlever des puits une fois le « Subset » créé, il faut sélectionner l'ensemble des nouveaux puits une nouvelle fois et cliquer « Apply » à nouveau.

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62
Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected
Database: My Computer (Research)
User: System Admin

Window: New Experiment

Subsets

ID	Name	Analysis	Report
1	All Samples	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2	Samples	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

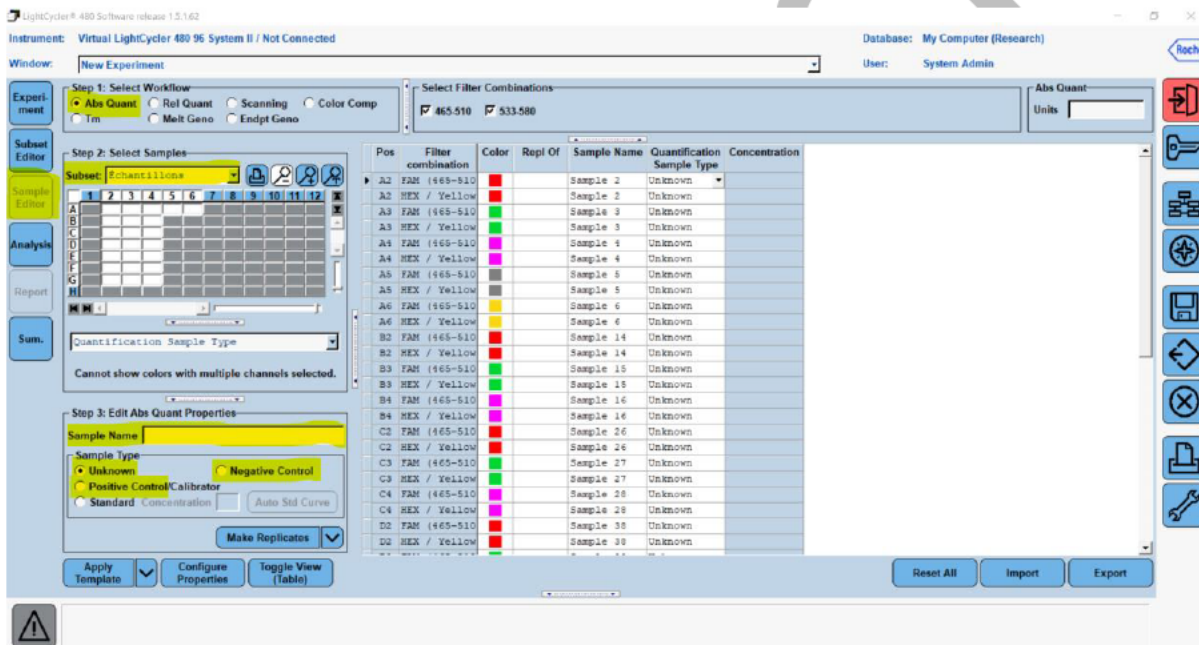
Samples settings

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Apply Clear Cancel

- 4) Dans le menu de gauche, cliquer sur « Sample Editor »;
- 5) Dans la fenêtre « Step 1 », cliquer sur le type d'analyse désirée, en l'occurrence « Abs Quant » pour une analyse qualitative ou quantitative;
- 6) Dans la fenêtre « Step 2 », sélectionner le « Subset » programmé à l'étape précédente;
- 7) Dans la fenêtre « Step 3 », inscrire les numéros de spécimens en cliquant sur la cellule du schéma de plaque correspondant au spécimen;


Sélectionner « Unknow », « Positive control » ou « Negative control » pour les spécimens, le contrôle positif et le contrôle négatif respectivement;
- 8) Cliquer sur « Toggle View (Table) » pour visualiser le schéma de plaque avec les numéros de spécimens et imprimer en cliquant sur l'icône d'impression dans le menu de droit;



La feuille de travail peut être faite une fois que l'analyse démarrée; par contre il est recommandé de la faire avant le démarrage afin d'avoir le schéma des échantillons sur la plaque en main lors de la mise en plaque

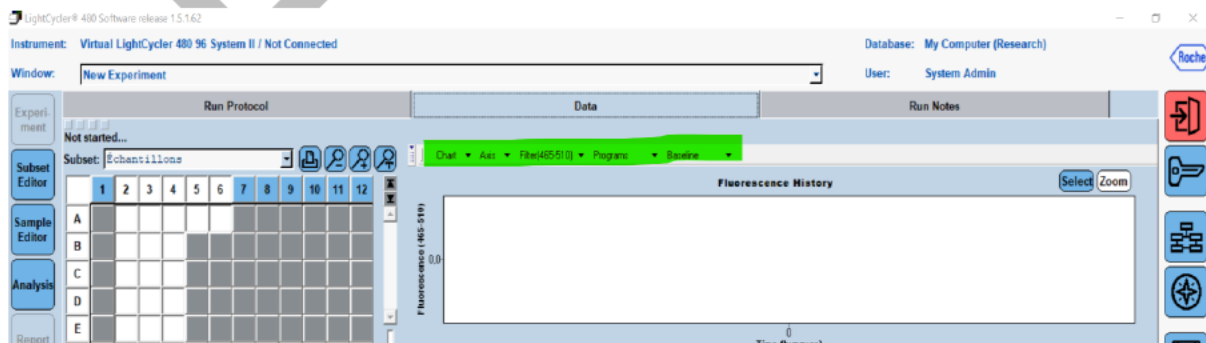
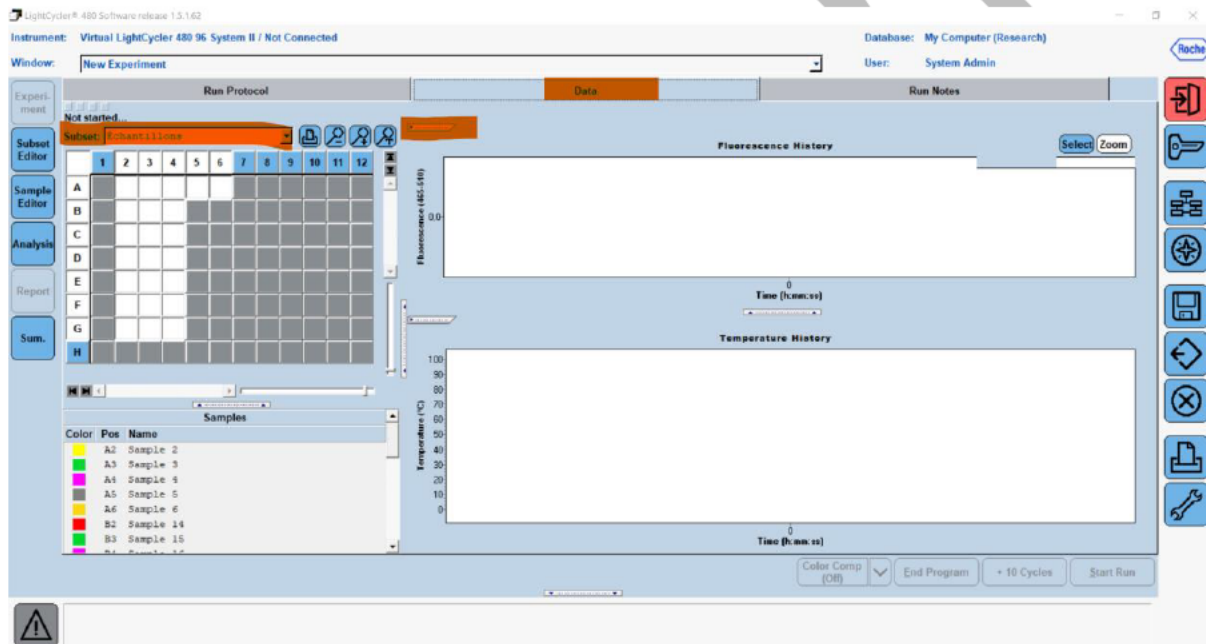
H) Démarrer l'analyse

- 1) Si désiré, cliquer sur l'onglet « Sum. » dans le menu de gauche afin de vérifier si les paramètres de l'analyse sont exacts;

- 2) Enregistrer l'analyse dans le dossier informatique approprié en cliquant sur l'icône  et nommer l'analyse selon le format : AAAAMMJJ-initiales
- 3) Cliquer sur l'onglet « Experiment » dans le menu de gauche afin de retourner dans les paramètres de cyclage et cliquer sur « Start Run » pour démarrer l'analyse.

I) « Monitoring » de l'analyse


- 1) Pour visualiser l'analyse en cours, dans le menu « Experiment », cliquer sur l'onglet « Data » et sélectionner le « Subset » ;
- 2) Cliquer sur la barre de pointillés au dessus de l'écran « Fluorescence History » afin de faire apparaître le menu de « monitoring » ;



- 3) Sélectionner les paramètres désirés (le canal de détection, les axes, etc.) afin de visualiser les résultats en temps réel et détecter si nécessaire des problèmes de température et/ou de fluorescence et/ou de lecture.

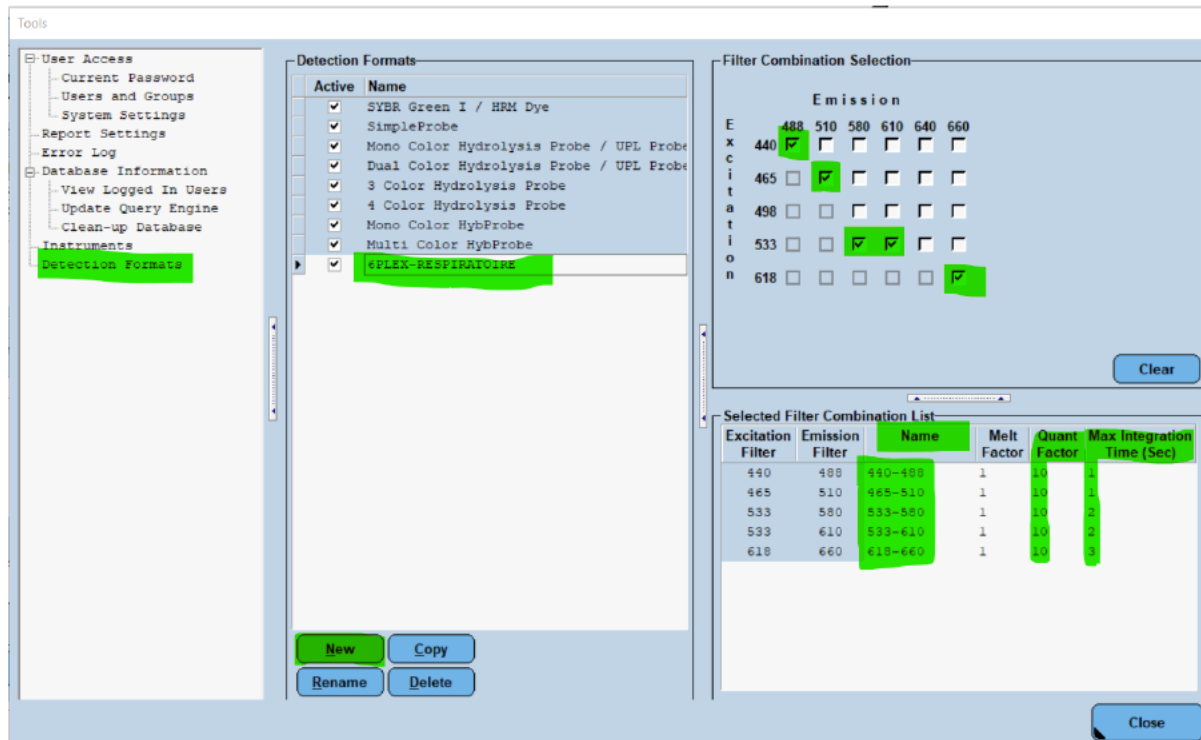
N.B. Le LC480 II ne permet pas de visualiser, ni pendant ni après l'analyse, l'ensemble des résultats en un schéma lorsque deux cibles ou plus sont détectées simultanément; il faut sélectionner un à un les combinaisons de filtres et faire l'analyse cible par cible.

J) Créer un format de détection

- 1) Dans le menu de droite, cliquer sur l'icône  et cliquer sur « Detection Format »;
- 2) Cliquer sur « New » et nommer le nouveau format de détection;
- 3) Sélectionner les combinaisons adéquates de filtres nécessaires;
- 4) Nommer les combinaisons de filtres selon la cible recherchée et/ou le fluorophore associé au filtre et inscrire le « Quant Factor » et le « Max Integration time » approprié à la combinaison de filtre (se référer au guide fourni avec l'ensemble de compensation de couleur Hexaplex).
- 5) Cliquer sur « Close ». Le format de détection s'enregistre automatiquement.

N.B. Si des changements sont effectués dans un format de détection existant pour une analyse créé à partir d'un template, les nouveaux changements ne seront pas appliqués; il faut créer un nouveau format de détection avec les changements désirés et sélectionner ce nouveau format de détection.

Si des changements effectués dans le format de détection pour une analyse créé à partir de « New experiment », ces derniers seront appliqués; ne pas changer des paramètres du format de détection si celui-ci est utilisé en routine.



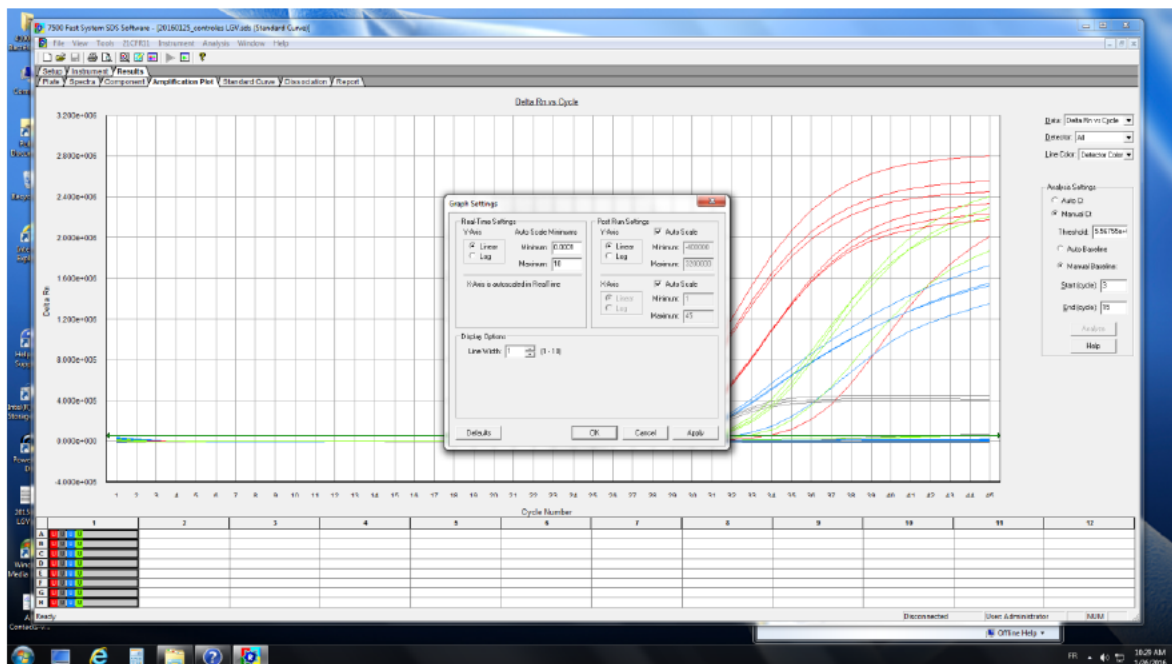
K) Analyse des résultats

i. À partir du poste informatique lié à l'appareil

Dans l'onglet « Amplification Plot »

- 1- Sélectionner tous les puits à analyser;
- 2- Placer le curseur sur le graphique et appuyer sur le bouton de droite de la souris pour faire apparaître la fenêtre « Graph Settings »;
- 3- Dans la section « Post Run Settings – Y Axis » sélectionner « Linear » et décocher l'option « Auto Scale »;
- 4- Une fois terminé, appuyer sur OK;
- 5- Dans l'écran « Amplification Plot », vérifier que le paramètre « Delta Rn vs cycle » est sélectionné;
- 6- Si la PCR comporte plusieurs cibles (i.e. PCR multiplexe), la valeur seuil (Threshold) peut être déterminée pour toutes les cibles à la fois en sélectionnant « All » dans l'onglet « Detector » ou de manière individuelle pour chaque cible en les sélectionnant une à une. Se référer à la procédure de l'analyse à effectuer pour plus de détails;
- 7- Une fois le « Threshold » fixé, appuyer sur « analyze »;

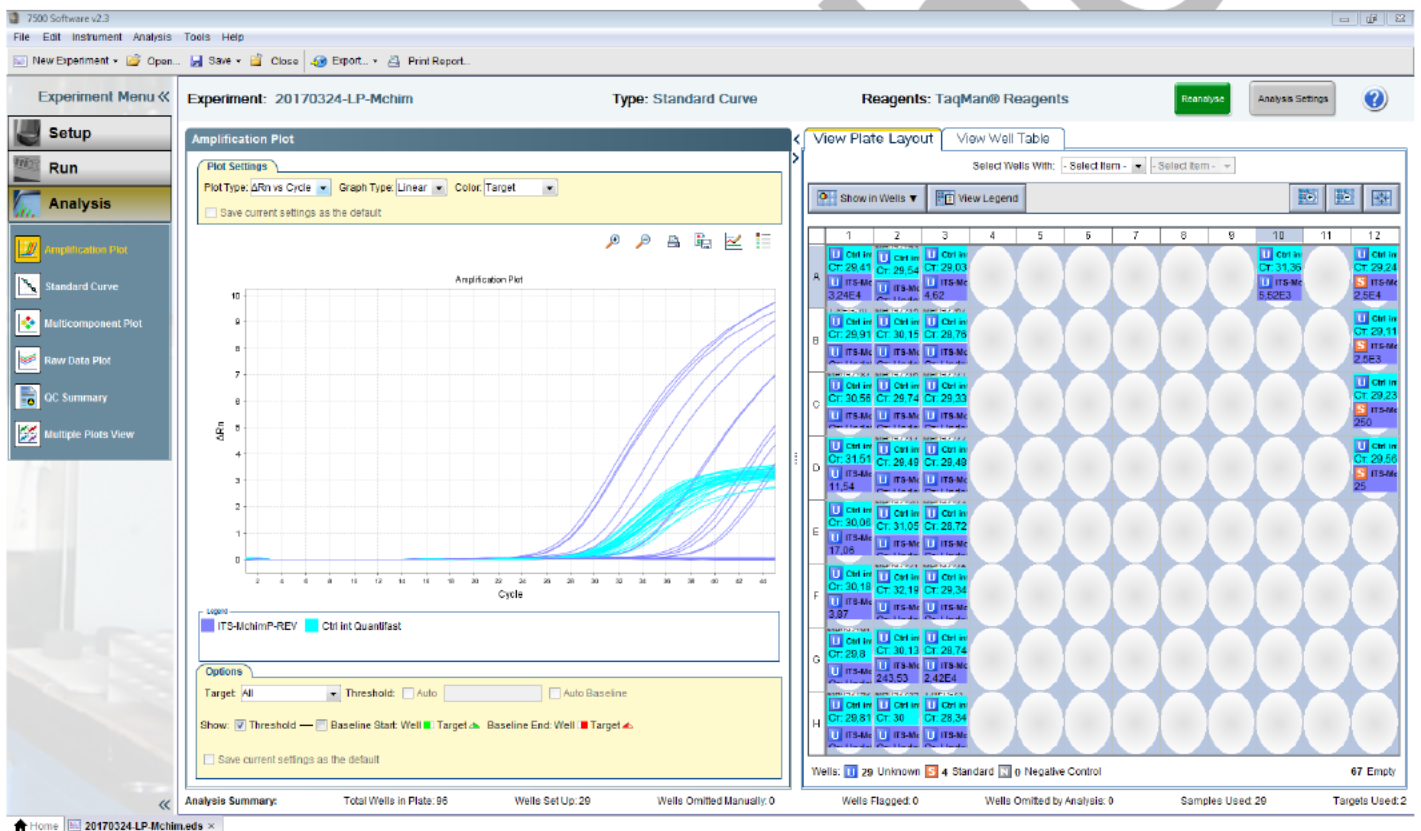
- 8- S'il s'agit d'une PCR multiplexe, dans le champ « Line Color », sélectionner « Detector Color ». Ceci permettra de différencier les cibles entre elles et facilitera l'interprétation des résultats.
- 9- Pour imprimer un rapport, aller dans l'onglet « report » puis appuyer sur « File » puis « Print ».



ii. Analyse à partir du poste de travail ;

Ouvrir l'application 7500 Software v2.3 sur un poste informatique personnel (pas dans Citrix)

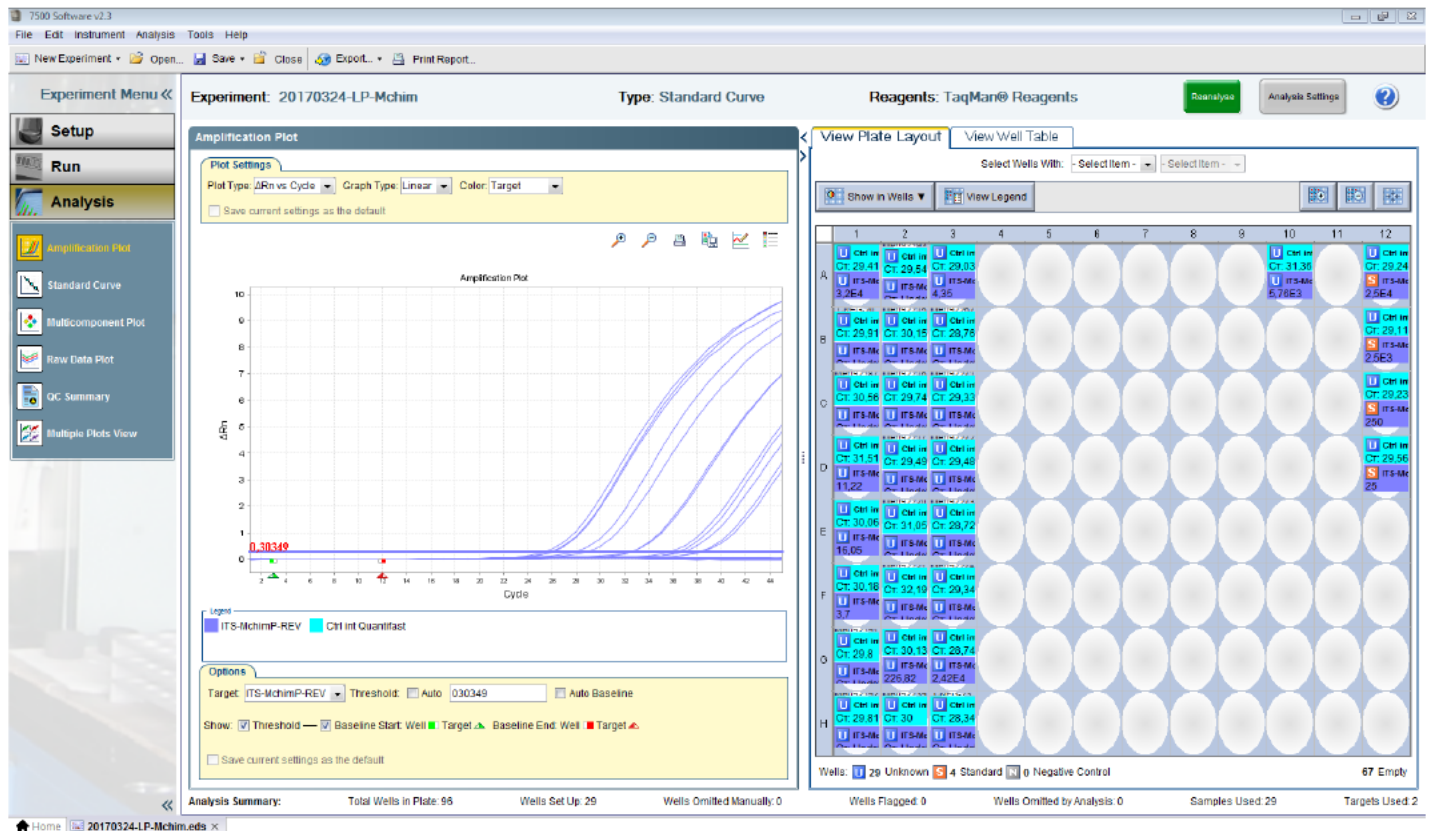
- 1- Ouvrir l'application et se connecter en tant que « GUEST »(user name) et cliquer sur « Continue without connection »;
- 2- Cliquer sur « Analyse experiment » et « LSPQ_PCR en temps reel» et sélectionner le fichier désiré;
- 3- Sélectionner les puits à analyser et sous l'onglet « Amplification Plot » et dans « Plot Settings », sélectionner « ΔRn vs Cycle », « Linear » et « Color : Target ».



4- Pour ajuster le « Threshold » :

- a) dans « options » sous le graphique, sélectionner une cible dans le menu déroulant « Target »;
- b) décocher « auto »;
- c) cocher « Show Threshold »;
- d) pour ajuster le « Threshold » : à l'aide du curseur, déplacer la ligne à la valeur désirée.

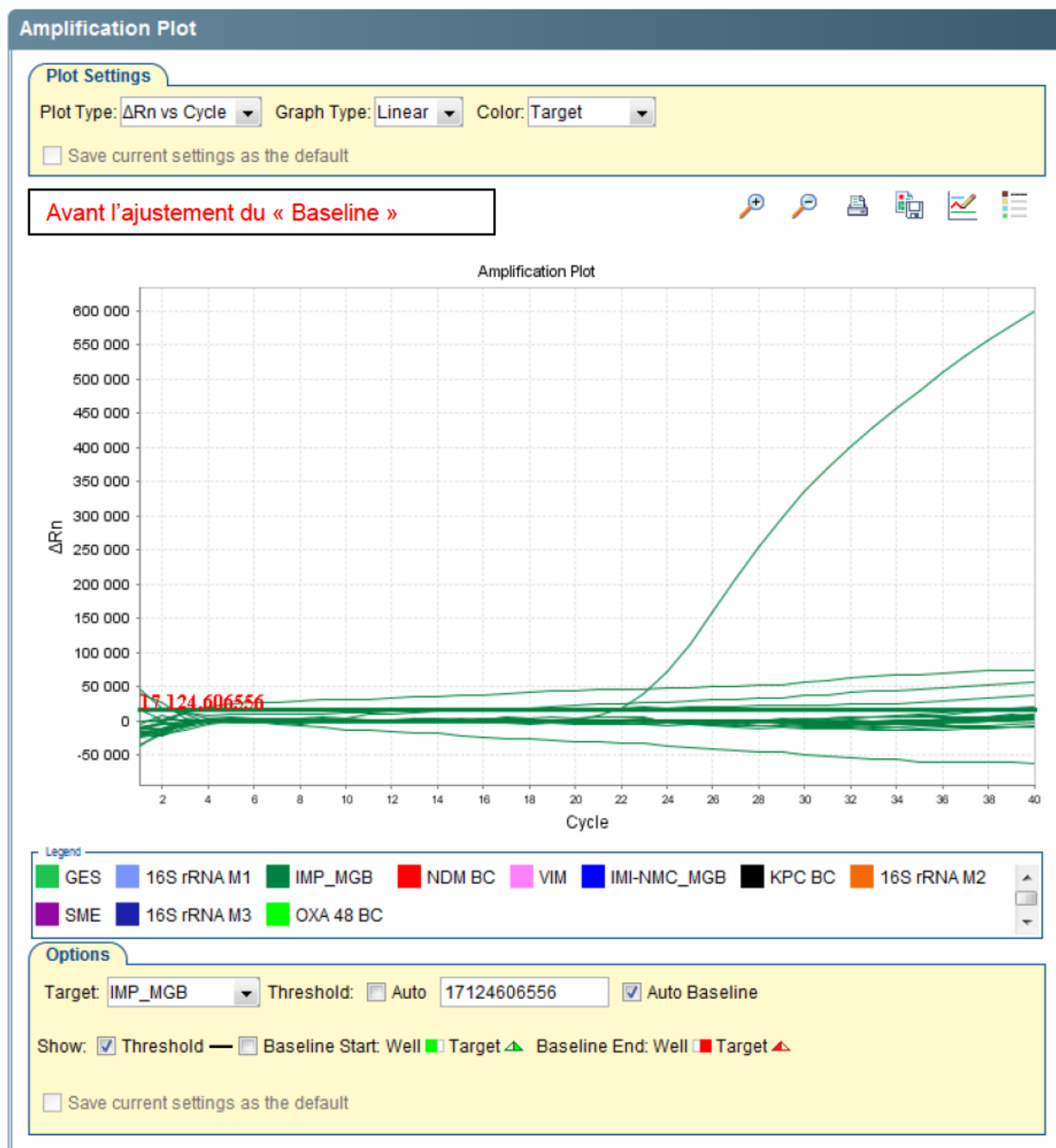
Il est possible d'ajuster le « Threshold » seulement une cible à la fois.

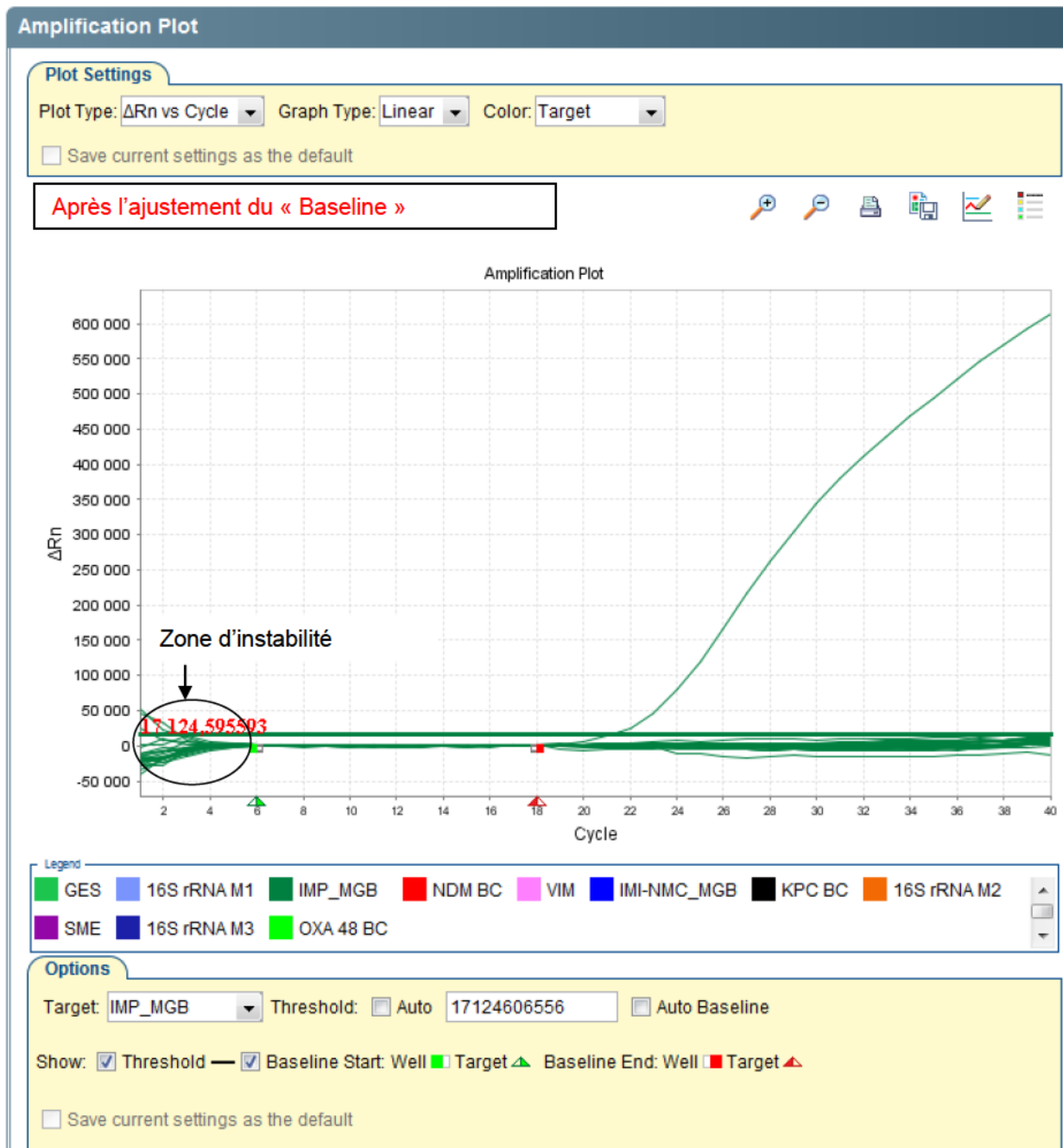


5- Pour ajuster le « Baseline » : cet ajustement n'est pas toujours nécessaire mais peut permettre de résoudre les problèmes associés à certaines courbes, par exemple lorsqu'une augmentation linéaire du signal fluorescent est observée. Pour corriger ce problème :

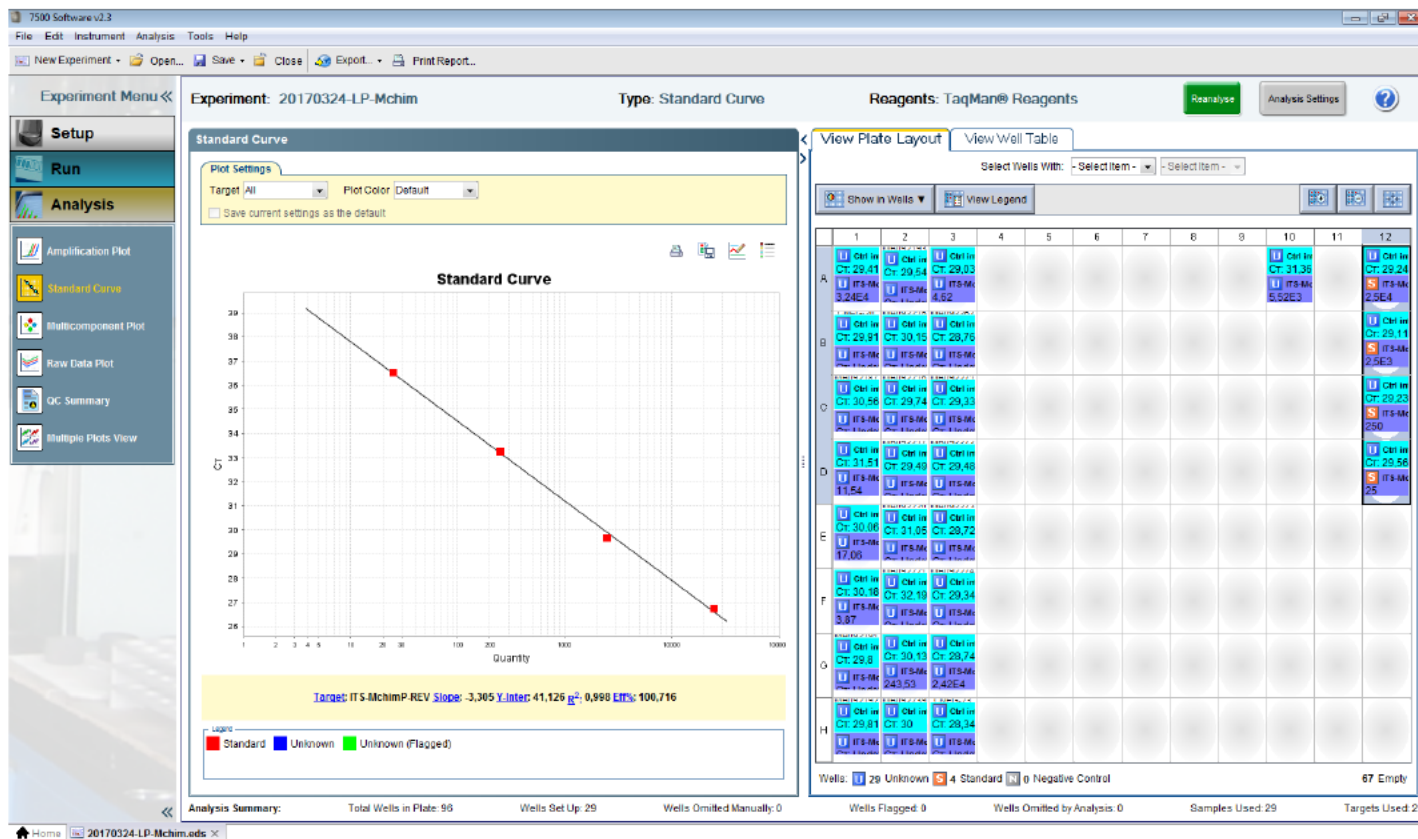
- dans « options » sous le graphique, sélectionner la cible problématique dans le menu déroulant « Target » ;
- décocher « Auto Baseline » ;
- cocher « Show Baseline » ;
- déplacer le triangle vert pour fixer le début du « Baseline » après la zone d'instabilité, si il y a lieu ;
- déplacer le triangle rouge pour fixer la fin du « Baseline » environ 2 Ct avant la courbe de la série d'analyse ayant la Ct la plus faible pour cette cible.

Il est possible d'ajuster le « Baseline » seulement une cible à la fois.





- 6- Pour afficher et analyser une courbe standard, cliquer sur l'onglet « Standard Curve » et sélectionner les puits des standards : vérifier que les valeurs des critères d'acceptabilité situées sous le graphique (« Slope », « R^2 » et « Eff% ») sont incluses dans les limites de la méthode.



- 7- Pour vérifier le niveau de fluorescence des différents détecteurs, cliquer sur l'onglet « Multicomponent Plot ».

- 8- Il est possible de rééditer les paramètres initiaux (ex. numéro de spécimen ou nom de fichier erroné, attirer une valeur à un standard, etc.) en cliquant sur « Setup » dans le menu de gauche et via les différents onglets, effectuer les modifications nécessaires.

- 9- Pour imprimer le rapport d'analyse, cliquer sur « Print report », décocher « Plate layout » et « QC summary »; si l'analyse n'a pas de courbe standard, décocher « standard curve »; selon les besoins, sélectionner « Results summary » ou « Results table » ou les deux si nécessaire. Visualiser le rapport via « Print preview » et cliquer sur l'icône « Imprimer ».

I. RÉFÉRENCES

- 1- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System - Installation and Maintenance Guide
- 2- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System - Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide

II. DOCUMENTS ASSOCIÉS

Voir les procédures, listes, aides-mémoire et registres associés aux techniques utilisant l'appareil 7500 Fast Dx.

Ébauche

Ébauche

1

Ébauche



Fait par : _____

Nom de fichier : _____

1. Listes des spécimens

Extraction 1 Mutations recherchées : _____

Position	Identification du spécimen	Position	Identification du spécimen	Position	Identification du spécimen
1		9		17	
2		10		18	
3		11		19	
4		12		20	
5		13		21	
6		14		22	
7		15		23	
8		16		24	

Extraction 2 Mutations recherchées : _____

Position	Identification du spécimen	Position	Identification du spécimen	Position	Identification du spécimen
1		9		17	
2		10		18	
3		11		19	
4		12		20	
5		13		21	
6		14		22	
7		15		23	
8		16		24	

No de lot RNA Viral Master Mix: _____ exp. _____

No de lot VirSnip 484K: _____ exp. _____

No de lot VirSnip 452R: _____ exp. _____

2. Contrôle positif : E484K : contrôle positif de la compagnie Roche associée à la trousse de criblage de la mutation
L452R : contrôle positif d'extraction

Contrôle négatif : E484K et L452R : contrôle négatif d'extraction

3. Mélange réactionnel

Réactifs	008327 <input type="checkbox"/>	008332 <input type="checkbox"/>	008826 <input type="checkbox"/>	Pré-PCR	005711 <input type="checkbox"/>	006328 <input type="checkbox"/>
	008328 <input type="checkbox"/>	008333 <input type="checkbox"/>	008827 <input type="checkbox"/>		008207 <input type="checkbox"/>	
	008330 <input type="checkbox"/>	008779 <input type="checkbox"/>	008989 <input type="checkbox"/>		008208 <input type="checkbox"/>	
	008331 <input type="checkbox"/>	008825 <input type="checkbox"/>	008990 <input type="checkbox"/>		008288 <input type="checkbox"/>	

Réactifs	Volume par réaction	484K	452R
Eau de la trousse	5.4 µl		
Amorces et sonde (bouchon jaune)	0.5 µl		
Master Mix	4,0 µl		
RT enzyme	0,1 µl		
Volume à distribuer		10 µl	
Volume d'ARN		10 µl	
Volume total		20 µl	

4. Programme d'amplification




Sélectionner le template SNP-SARSCOV et enregistrer dans le format AAAA/MM/JJ-nom de la mutation dans le dossier : EXPERIMENTS/VARIANTS-COVID-ROUTINE

	Mode	Température	Durée	Cycle	Ramp rate
Amplification	RT	55 °C	5 min.	1	4,4
	Dénaturation	95 °C	5 min.	1	4,4
	Cycles	95°C	5 sec.	45 cycles	4,4
		60°C	15 sec.		2,2
72°C		15 sec.	4,4		
Melting curve		95°C	30 sec.	Acquisition mode : continuous Acquisitions [per °C] : 3 Melting slope : entre 0.19 et 0.29 °C/s	4,4
		40 °C	2 min.		1,5
		75 °C	0:00 minute		N/A
Refroidissement		40 °C	30 sec.	N/A	1,5

Création et entrée des résultats en série; consulter la PR-SGIL-021.

Analyse SGIL/ BM : 2019-nCoV, code **NCOV**

Cette analyse est effectuée sur le Quantstudio (QS3/QS5).

- Au tableau de bord dans SGIL, sélectionner  Entrée des résultats par série (99)
- Sélectionner l'analyse «2019-nCoV (PR-BM-131)»
- Assigner un «ID équipement» et le nom de la personne qui fait l'analyse;
- Assigner les échantillons;
-  Ajouter des CQ à partir d'un gabarit (C-E SARS2, C+E SARS2, C-E2 SARS2, C+E2 SARS2 C-E3 SARS2, C+E3 SARS2 C-E4 SARS2, C+E4 SARS2), ajouter/supprimer des contrôles au besoin selon le nombre d'extraction à la série.
- Cliquer sur  Créer série

La série des résultats complétés doit être sauvegardée à l'adresse: Z:\LSPQ_PCR en temps réel\QS3\SARS-CoV-2

Seul l'analyte en bleu sont imprimés au rapport.

Analytes (Champ Description)	Valeurs à rapportées (avec deux décimales)		Seuil à ajuster manuellement au QS3
2019-nCoV ARN (SARS-CoV-2)	N/A	Détecté / Non-détecté / Indéterminé /Non effectuée	N/A
CoVN (LSPQ) ARN	Ct: 0 ≤37	Détecté	N/A
CoVN (LSPQ) Ct	Ct: ≥ 37.01 (inscrire le code 99 au SGIL)	Non-détecté	10 000
* Échantillons regroupés?	N/A	Oui / Non	N/A

* Un commentaire apparaît au rapport seulement si la valeur est « **Oui** ».

Saisie des résultats :

Deux (2) options sont disponibles, soit :

A- Avec l'interface (option à prioriser)

1. Cette analyse utilise une interface associée au Quantstudio (QS3/QS5)


La série des résultats complétée doit être :


- Sauvegardée à l'adresse: Z:\LSPQ_PCR en temps réel\QS3\NCOV
- Exportée via l'onglet «Export» du QS3/QS5 en format **.txt** à l'adresse :

Z:\Starlims_Grabber\Biologie moleculaire\QuantStudio\NCOV.


Une fois les résultats exportés, compléter manuellement l'analyte « **Échantillon regroupé?** » dans la série.

2. Sélectionner l'analyte **Échantillon regroupé?** du premier échantillon, puis saisir le résultat qui s'applique à la majorité des échantillons de la série, soit
 - Oui : pour les échantillons analysés dans un pool, OU
 - Non pour les échantillons analysés individuellement




Pour se faire, cliquer sur l'item «  [Schéma](#) » et sélectionner l'option « Résultats communs ». Tous les champs vides de la série seront alors complétés avec la valeur saisie. Pour une série mixte, c'est-à-dire qui contient des échantillons poolés et des échantillons unitaires, modifier manuellement le résultat de l'analyte des échantillons qui ont un résultat différent de la majorité.

3. Lorsque l'inscription des résultats est terminée, appuyer sur  Terminer entrée de résultats

B- Saisie manuelle (option alternative)

1. Dans l'onglet «  Entrée des résultats par série (99) », à l'analyse 2019-nCoV, sélectionner la série.
2. Saisir manuellement les résultats de tous les contrôles négatifs et positifs de la série.
3. Inscrire **TOUS** les résultats des échantillons « DéTECTÉS » en premier en inscrivant le résultat CoVN (LSPQ) ARN en premier, ensuite la valeur Ct. Le champs de l'analyte 2019-nCoV ARN se complètera automatiquement.

Analyte	Dilution	Résultat
2019-nCoV ARN		DéTECTÉ
1- CoVN (LSPQ) ARN		DéTECTÉ
2- CoVN (LSPQ) Ct		16,646

4. Inscrire « Non » à l'analyte [Échantillon regroupé?](#) pour tous les échantillons qui ont été analysés de façon unitaire (pas dans un pool)
5. Cliquer sur l'item «  [Schéma](#) » et sélectionner l'option «  Saisir résultat par défaut ». Tous les champs vides de la série seront saisis comme suit :
6. « Non détecté » pour l'analyte CoVN (LSPQ) ARN
7. « 99 » pour l'analyte CoVN (LSPQ) Ct
8. « Oui » pour l'analyte Échantillons regroupé?
9. Lorsque l'inscription des résultats est terminée, appuyer sur  Terminer entrée de résultats

Pour les **reprises**, dans l'écran RRR, appuyer sur « Réanalyser » et choisir le nombre de réplicats 1 ou 2. Les lettres A et/ou B seront ajoutées à la fin du numéro de l'échantillon.

Algorithme pour la saisie automatique des commentaires:

Analyte/Analyse	Résultat final inscrit	Commentaire automatique
2019-nCoV	TOUS <u>sauf</u> « Non effectuée »	Résultat obtenu par une technique de détection d'acides nucléiques non commerciale et non approuvée par Santé Canada.
<u>2019-nCoV ARN</u>	Non détecté	Pour les travailleurs de la santé ou les patients hospitalisés chez qui la probabilité clinique d'une Covid-19 est jugée élevée, il est recommandé de répéter l'analyse 48-72 heures après le premier prélèvement.
<u>2019-nCoV ARN</u>	DéTECTÉ	Maladie à déclaration obligatoire. Déclaration faite à la DSP d'origine du patient.
<u>2019-nCoV ARN</u>	Indéterminé	Il est suggéré de soumettre un nouvel échantillon si cliniquement indiqué.
<u>Échantillons regroupés?</u>	Oui	Analyse réalisée sur un groupement d'échantillons (pool)




N.B. Pour toute situation non couverte par ce tableau, voir avec le responsable de l'analyse. Pour les étapes de validation, consulter la PR-SGIL-023.



Création et entrée des résultats en série; consulter la PR-SGIL-021.

Analyse SGIL/ BM : COVID-19-Confirmation, code **CCOV**

Cette analyse est effectuée sur le Quantstudio (QS3/QS5).


- Au tableau de bord dans SGIL, sélectionner  Entrée des résultats par série (99)
- Sélectionner l'analyse «2019-nCoV (PR-BM-131)»
- Assigner un «ID équipement» et le nom de la personne qui fait l'analyse;
- Assigner les échantillons;
-  [Ajouter des CQ à partir d'un gabarit](#) (C-E SARS2, C+E SARS2, C-E2 SARS2, C+E2 SARS2), ajouter/supprimer des contrôles au besoin selon le nombre d'extraction à la série.
- Cliquer sur  Créer série

La série des résultats complétés doit être sauvegardée à l'adresse :
Z:\LSPQ_PCR en temps réel\QS3\SARS-CoV-2

Seul les analytes en bleu sont imprimés au rapport.

Analytes (Champ Description)	Valeurs à rapportées (avec deux décimales)		Seuil à ajuster manuellement au QS3
2019-nCoV ARN (SARS-CoV-2)	N/A	Détecté / Non-détecté / Indéterminé /Non effectuée	N/A
CoVN (LSPQ) ARN	Ct: $0 \leq 37$	Détecté	N/A
CoVN (LSPQ) Ct	Ct: ≥ 37.01 (inscrire le code 99 au SGIL)	Non-détecté	10 000
E-Corman ARN	Ct: $0 \leq 37$	Détecté	N/A
E-Corman Ct	Ct: ≥ 37.01 (inscrire le code 99 au SGIL)	Non-détecté	10 000




Saisie des résultats

1. Dans l'onglet  Entrée des résultats par série (99), à l'analyse 2019-nCoV, sélectionner la série.
2. Saisir manuellement les résultats de tous les contrôles négatifs et positifs de la série.
3. Inscrivez **TOUS** les résultats des échantillons «Détectés» en premier en inscrivant le résultat CoVN (LSPQ) ARN en premier, ensuite la valeur Ct. Le champs de l'analyte 2019-nCoV ARN se complètera automatiquement.

Analyte	Dilution	Résultat
2019-nCoV ARN		Détecté
1- CoVN (LSPQ) ARN		Détecté
2- CoVN (LSPQ) Ct		16,646

4. Inscrire « Non » à l'analyte **Échantillon regroupé?** pour tous les échantillons qui ont été analysés de façon unitaire (pas dans un pool)

Analyte	Dilution	Résultat	Résultat final
2019-nCoV ARN		Non détecté	Non détecté
CoVN (LSPQ) ARN		Non détecté	Non détecté
CoVN (LSPQ) Ct		99	99,00
Échantillon regroupé?		Non	Non

1. Cliquer sur l'item «  Schéma » et sélectionner l'option «  Saisir résultat par défaut ». Tous les champs vides de la série seront saisis comme suit :
2. « Non détecté » pour l'analyte CoVN (LSPQ) ARN
3. « 99 » pour l'analyte CoVN (LSPQ) Ct
4. « Oui » pour l'analyte Échantillons regroupé?
5. Lorsque l'inscription des résultats est terminée, appuyer sur  Terminer entrée de résultats .

Pour les **reprises**, dans l'écran RRR, appuyer sur « Réanalyser » et choisir le nombre de réplicats 1 ou 2. Les lettres A et/ou B seront ajoutées à la fin du numéro de l'échantillon.




Algorithme pour la saisie automatique des commentaires :

Analyte	Résultat final inscrit	Commentaire automatique
SARS-CoV-2	TOUS <u>sauf</u> « Non effectuée »	Résultat obtenu par une technique de détection d'acides nucléiques non commerciale et non approuvée par Santé Canada.
SARS-CoV-2	Non détecté	Pour les travailleurs de la santé ou les patients hospitalisés chez qui la probabilité clinique d'une Covid-19 est jugée élevée, il est recommandé de répéter l'analyse 48-72 heures après le premier prélèvement.
SARS-CoV-2	Détecté	Maladie à déclaration obligatoire. Déclaration faite à la DSP d'origine du patient.
SARS-CoV-2	Indéterminé	Il est suggéré de soumettre un nouvel échantillon si cliniquement indiqué.
SARS-CoV-2	Non effectuée	La confirmation est non requise pour les échantillons avec un Ct < 37. Si une confirmation reste souhaitée, veuillez nous faire parvenir la justification.


N.B. Pour toute situation non couverte par ce tableau, voir avec le responsable de l'analyse. Pour les étapes de validation, consulter la PR-SGIL-023.








Création et entrée des résultats en série; consulter la PR-SGIL-021.

Analyse SGIL/ BM : Mutations SARS-CoV-2, code **VMUT**
Cette analyse est effectuée sur le Quantstudio (QS3/QS5).

- Au tableau de bord dans SGIL, sélectionner  Entrée des résultats par série (99)
- Sélectionner l'analyse «Mutations SARS-CoV»
- Assigner un «ID équipement» et le nom de la personne qui fait l'analyse;
- Assigner les échantillons;
-  [Ajouter des CQ à partir d'un gabarit](#) (C-E SARS2, C+E SARS2, C-E2 SARS2, C+E2 SARS2), ajouter/supprimer des contrôles au besoin selon le nombre d'extraction à la série.
- Cliquer sur  Créer série


La série des résultats complétés doit être sauvegardée à l'adresse :
Z:\LSPQ_PCR en temps réel\QS3\SARS-CoV-2

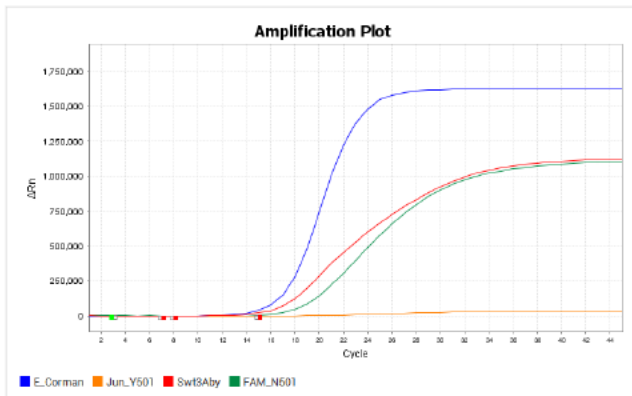
Les analytes avec une flèche «» sont déclarés au rapport.

Analytes (Champ Description)	Valeurs à rapportées (avec deux décimales)		Seuil à ajuster manuellement au QS3
E-Corman ARN	Ct: 0 ≤ 37	Détecté	N/A
 E-Corman Ct	Ct: ≥ 37.01 (inscrire le code 99 au SGIL)	Non-détecté	manuel
 Del69-70	Inscrire la valeur tel qu'inscrite au rapport du QS3/QS5.	Détecté (courbe aplatie)*	N/A
 Del69-70 Ct		Non-détecté (courbe exponentielle) Indéterminé	manuel
N501	Inscrire la valeur tel qu'inscrite au rapport du QS3/QS5.	Détecté	N/A
 N501 Ct		Non-détecté	manuel
 N501Y		Indéterminé (Si aucune courbe positive entre N501 et N501Y)	
 N501Y Ct			
 484K	0 (si non effectuée) Valeur de Tm en °C	Non effectuée	Analyse effectuée au secteur IDBM
484 Tm		Détecté Non détecté	

*Voir schémas à la page suivante.

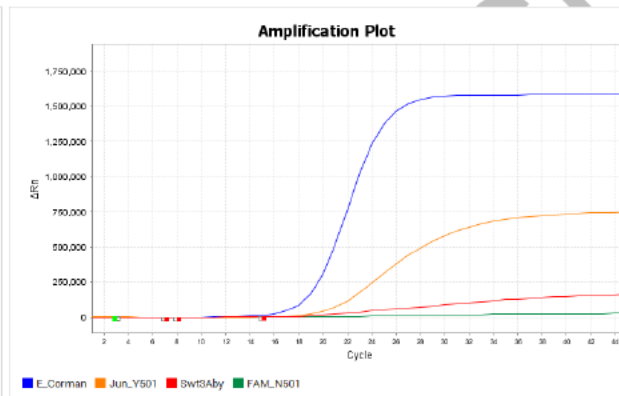
Saisie des résultats

1. Dans l'onglet «  Entrée des résultats par série (99) », à l'analyse Mutations SARS-CoV-2, sélectionner la série.
2. Saisir manuellement les résultats de tous les contrôles négatifs et positifs de la série.
3. Faire «Saisir résultats par défaut» pour les 2 analytes associés au 484 (484K et 484Tm). Il sera alors inscrit : «Non effectuée» et «0».
4. Saisir manuellement les résultats pour les valeurs Ct ainsi que pour chaque analyte. Voir quelques exemples possibles de résultats dans les schémas suivants :



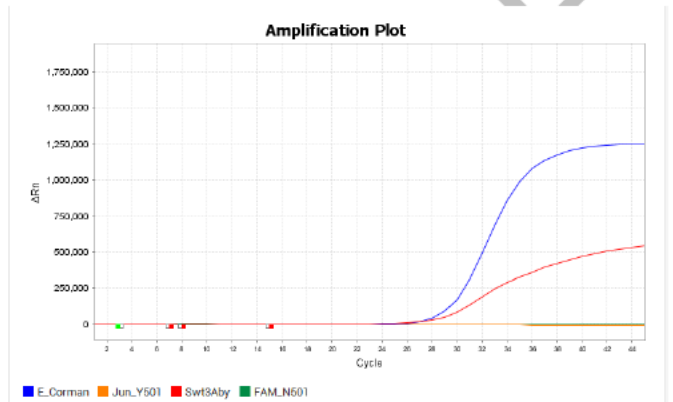
Échantillon WT (wild type)

Target dans SGIL	Interprétation
E-Corman	Déecté
Swt3Aby	Non-déecté
FAM_N501	Déecté
JUN_Y501	Non déecté

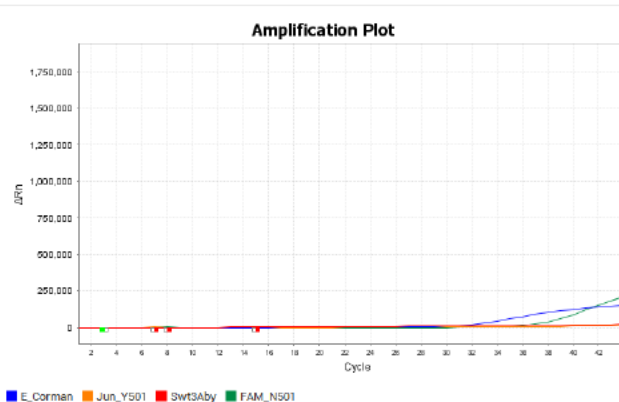


Échantillon variant anglais


Target dans SGIL	Interprétation
E-Corman	Déecté
Swt3Aby	Déecté
FAM_N501	Non déecté
JUN_Y501	Déecté



Target dans SGIL	Interprétation
E-Corman	Déecté
Swt3Aby	Non-déecté
FAM_N501	Indéecté
JUN_Y501	Indéecté



Target dans SGIL	Interprétation
E-Corman	Déecté
Swt3Aby	Indéecté
FAM_N501	Déecté
JUN_Y501	Non déecté

5. Lorsque l'inscription des résultats est terminée, appuyer sur  Terminer entrée de résultats.

Pour les **reprises**, dans l'écran RRR, appuyer sur « Réanalyser » et choisir le nombre de réplicats 1 ou 2. Les lettres A et/ou B seront ajoutées à la fin du numéro de l'échantillon.

Le responsable de l'analyse, lors de la validation, décidera si l'analyse de la mutation 484K doit être effectuée par le secteur IDBM. Dans cette situation, les échantillons seront sélectionnés par le responsable, un technicien de l'équipe BM ira porter les extraits d'acides nucléiques avec les registres d'identification au secteur IDBM. Le responsable de IDBM transfèrera ensuite les résultats au responsable de BM qui inscrira les résultats dans SGIL et ensuite pourra faire l'émission du résultat final.

Algorithme pour la saisie automatique des commentaires :

Analyte	Résultat final inscrit	Commentaire automatique
N501Y et/ou del69-70 et/ou N501 et/ou 484K	TOUS <u>sauf</u> « Non effectuée »	Épreuve RT-PCR effectuée avec une épreuve maison; veuillez interpréter le résultat avec circonspection.
N501Y et/ou del69-70 et/ou et/ou 484K	Déecté	Maladie à déclaration obligatoire. Déclaration faite à la DSP d'origine du patient.
E-Corman Ct	Valeur Ct>30	Le résultat E-Corman Ct étant supérieur à 30,0, l'analyse COVID-19 - Surveillance WGS ne sera pas été effectuée.

N.B. Pour toute situation non couverte par ce tableau, voir avec le responsable de l'analyse. Pour les étapes de validation, consulter la PR-SGIL-023.

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

Extractions automatisées d'acides nucléiques - plate-forme NucliSENS™ - easyMAG de bioMérieux

Noms

Auteur(s) : Micheline Lortie

Réviseur(s) : Lyne Désautels

Joel Ménard

Approbateur : Hugues Charest

Coordonnateur du document : Lyne Désautels

Cette page se veut intentionnellement sans texte
COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace le document PR-BM-052 version 04.

Les modifications apportées sont décrites au tableau ci-dessous.

Section	Modification	Justification
V. Matériel requis Réactifs	Ajout corning 50 ml.	Nouvel item utilisé.
IX. Exposé de la procédure	Ajout d'une nouvelle option d'ajout des codes-barres réactif et/ou navette.	Nouvelle option.
	Ajout d'une 2 ^e façon de fabrication de la silice magnétique pour gros volume.	Nouvelle option.

II. CHAMPS D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire

III. PRINCIPE

La plate-forme NucliSENS™ - easyMAG est conçue pour l'extraction automatisée (purification et concentration) d'acides nucléiques (ARN/ADN) totaux à partir d'échantillons biologiques. Les acides nucléiques extraits se lient à une silice magnétique.

Cette plate-forme permet d'extraire jusqu'à 24 échantillons ou contrôles simultanément. Les réactifs sont utilisés selon les recommandations et protocoles fournis par le manufacturier.

IV. SPÉCIMENS

- Spécimen respiratoire tel que : écouvillonnage de gorge, de nez, sécrétions (aspiration, expectoration) nasopharyngées ou endotrachéales, lavage broncho-alvéolaire. Ces types d'échantillons sont habituellement conservés dans un milieu de transport viral tamponné.
- Surnageant de culture virale et bactérienne.
- Selle, sang, sérum, plasma-EDTA, plasma-ACD (acide citrique-dextrose). Les protocoles d'extractions associés à ces spécimens doivent être validés au préalable.
- Écouvillon anal, rectal ou extra-génital
- Eau (prélèvement environnemental)

Cette liste n'est pas exhaustive

Au besoin le volume d'échantillon initial peut être augmenté en ajoutant du milieu de transport viral, de la saline ou MEM. Il faut toutefois tenir compte de cette dilution lors de l'interprétation du résultat. La dilution d'un échantillon clinique avant l'extraction doit être documentée sur les registres de travail.

V. MATÉRIEL REQUIS

Équipement

- Instrument NucliSENS™ - easyMAG du fabricant bioMérieux
- Logiciel NucliSENS easyMAG version 2.0 ou supérieure
- Agitateur-mélangeur à Vortex
- Bloc chauffant
- Récipients pour matériel contaminé de type Conocup
- Microcentrifugeuse
- Micropipettes de 2 à 1000 µl
- Pipette électronique multi-canaux préprogrammée BIOHITe1200
- Embouts tamponnés associés stériles et certifiés exempt de RNAses
- Portoir de navettes métallique
- NucliSENS - easyMAG Disponables (navettes et peignes d'aspiration)
- Minuterie
- Thermomètre calibré pour une lecture de 55°C
- Thermomètre calibré pour température pièce (20-25°C)
- Colonnes QIAshredder (QIAGEN # cat 79656)
- Pipettes de transfert
- Tubes de type Sarstedt (1,5 ml et 2,0 ml) stériles
- Tubes de type Corning (50 mL)
- Tubes de collection ou équivalent pour la conservation des acides nucléiques et lisières de bouchons associées
- Nettoyant NOVUS (Plastic Clean & shine)
- Alcool 70%
- Eau purifiée type II

Réactifs

- Eau de type DEPC (diéthyl-pyrocarbonate)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 1
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 2
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 3
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica
- Protéinase K -Tris-HCl (AI-BMRC-020)
- MEM (Minimum Essential Medium 1X) ou équivalent
- contrôle interne MS2 de la trousse NxTAG® Respiratory Pathogen Panel de Luminex

VI. MAINTENANCE

Compléter le registre de maintenance RE-BM-243.

Les recommandations du fabricant sont les suivantes :

A. Inspection quotidienne (à chaque jour d'utilisation) :

- Vérifier le bac d'égouttement

B. Inspections et entretiens hebdomadaire (ou première utilisation de la semaine):

- Éteindre l'ordinateur et l'instrument (Annexe1)
- Nettoyer les vitres de l'instrument avec le nettoyant NOVUS
- Vérifier les filtres à charbon
- Essuyer et nettoyer l'instrument à l'alcool 70%
- Vérifier le conteneur de déchets et le vidanger si nécessaire
- Vérifier si les joints d'étanchéité (O-rings) sont bien en place et rechercher la présence de cristaux sur les joints toriques.
- Vérifier le filtre de la prise d'air des flacons de réactifs. Si nécessaire le remplacer. Pour le retirer il faut piquer le filtre avec un objet pointu.
- Examiner les embouts de distribution. Si nécessaire nettoyer les deux embouts de distribution des réactifs, ils sont situés à droite sur l'appareil. Éliminer les cristaux avec un coton-tige trempé dans un tube d'eau DEPC. Nettoyer avec un mouvement vers le bas.
- Rechercher la présence de cristaux de guanidine sur les attaches et les bouchons des réactifs, ainsi que sur les joints des peignes d'aspiration. Si nécessaire, éliminer les cristaux avec un coton-tige trempé dans un tube d'eau DEPC. Changer de coton-tige à chaque buse.
- Nettoyer l'extérieur des aiguilles de distribution manuellement. Au besoin exécuter le protocole de maintenance suivant (protocole de maintenance 1).

Sous le menu «Maintenance»

1. Cliquer sur «Clean Dispense Needles»
2. Placer 3 navettes et 3 peignes
3. Cliquer sur le triangle vert pour lancer le nettoyage

- Effacer régulièrement les 'Runs'
 1. Cliquer sur l'icône de création d'une liste
 2. Cliquer sur la loupe du sous-menu
 3. Série non archivée
 4. Aller vers l'entonnoir
 5. Sélectionner les 'Runs' à effacer
 6. Déposer dans la corbeille

- Comment réutiliser le code-barres des navettes?
 1. Retourner sur l'écran des disponibles (jetables)
 2. Arrêter la 'Runs'; carré rouge à droite
 3. Dans le sous-menu, aller vers la loupe
 4. Surligner la 'Runs'
 5. Déplacer vers la corbeille
 6. Le code-barres est à nouveau disponible

C. Inspections et entretiens occasionnels:

Des maintenances périodiques sont effectuées par bioMérieux selon une grille établie.

VII. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Sauf exception, chaque série d'extraction doit inclure une série de témoins comprenant au moins un contrôle négatif et un contrôle positif. Consulter les procédures techniques des pathogènes recherchés pour le choix des contrôles.

Par exemple, pour les échantillons détectés à l'aide de la trousse NxTag RPP de Luminex, il n'y a pas de contrôle positif à extraire, toutefois la trousse inclut un contrôle interne (solution du phage MS2) qui doit être ajouté à chaque échantillon respiratoire avant l'étape de l'extraction des acides nucléiques ainsi qu'un contrôle négatif d'extraction.

- Compléter le registre RE-BM-182 « Extractions d'acides nucléiques sur le NucliSens – easyMAG »
- Les tampons NucliSens® easyMAG® Lysis Buffer, Extraction Buffer 1, Extraction Buffer 2 et Extraction Buffer 3 doivent être laissés à bord jusqu'à épuisement, ou pour un maximum de 30 jours suivant l'ouverture du contenant. Indiquer la date d'ouverture sur celui-ci.
- La réserve de tampon NucliSens® easyMAG® Extraction Buffer 3 est entreposée entre 2 et 8°C.

- La réserve de silice NucliSens® easyMAG® Magnetic Silica est entreposée entre 2 et 8°C. Une fois reconstituée avec l'eau DEPC, elle se conserve deux (2) semaines dans ces mêmes conditions.
- Lors de la qualification d'un nouveau réactif; compléter le fichier Excel « BM Réception-Qualification ».

VIII. PRÉCAUTIONS SPÉCIALES

- Les tampons NucliSens® easyMAG® Lysis Buffer et NucliSens® easyMAG® Extraction Buffer 1 contiennent du thiocyanate de guanidine. Récupérer les déchets du conteneur à déchets et les transvider dans un récipient identifié et prévu à cet effet. Le secteur Physico-chimie est responsable de l'élimination de ces déchets.
- Toujours attendre que le sablier soit immobile à l'écran (bas, au centre) avant d'ouvrir la porte de l'extracteur.
- Lors du remplacement des bouteilles de tampons, éviter de mouiller les filtres d'air sur les bouchons.
- Les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (Annexe 2). Du milieu de culture viral peut être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail.** Une centrifugeuse avec couvercle étanche est utilisée pour la centrifugation des échantillons. Elle est utilisée et ouverte dans une ESB.
- Toutes les manipulations d'échantillons sont effectuées dans une enceinte de sécurité biologique (ESB) selon les pratiques prévues au document PR-BS-002.

IX. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

N.B : Laisser la porte de l'appareil fermée pour éviter la contamination.

1. Vérifier le statut des réactifs, pour chacune des 4 bouteilles. Scanner respectivement l'étiquette portant le code-barres de la position (A à D) ou sélectionner à l'écran la position désirée, puis le code-barres sur la bouteille du réactif correspondant. Les bouteilles restent à bord de l'appareil jusqu'à l'épuisement des réactifs ou pour un maximum de **30 jours**.
2. Créer la liste de travail et définir la demande d'extraction. Consulter l'aide-mémoire AI-BM-067 pour toutes les informations relatives à la programmation de l'appareil.

3. Créer la '**Run**,' icône 'Organiser séries' (→ ←), appuyer sur l'icône représentant un soleil, à droite de l'écran, ex. Série : **RUN_20110908**, appuyer sur OK.
4. Lier la liste de travail à celle-ci, icône 'Charger séries' (>>>>), et définir ces paramètres : (incubation de lyse hors ou dans l'instrument et incubation de silice dans l'instrument).

Incubation de lyse hors instrument (lyse manuelle)

- Installer les navettes et les peignes d'aspiration, (scanner d'abord le code - barres de la position (A, B ou C) ou sélectionner la position à l'écran, puis le code-barres de la navette correspondante). Imprimer la liste de chargement.
- Fermer le couvercle de l'instrument et procéder avec la demande automatique de distribution de tampon de lyse (2 ml) en cliquant sur l'icône **Dispense lysis**. À la fin du processus, attendre l'**arrêt** complet du sablier situé au bas de l'écran, au centre, avant de poursuivre.

Note : L'ajout de MS2 (contrôle interne), pour les trousse de pathogènes respiratoires peut se faire avant ou après la distribution de la lyse.

- Récupérer les navettes. Sous une ESB, distribuer le volume d'échantillon requis (tableau 1) et mélanger très légèrement par pipetage répétitif, en évitant la formation de bulles et d'aérosols.
- Incuber à température ambiante pendant 10 minutes ou plus. Noter la température et l'heure sur le registre RE-BM-182.
- Lorsque l'incubation terminée, remettre les navettes à leur position initiale dans l'appareil. (scanner d'abord le code-barres de la position (A, B ou C) ou sélectionner la position à l'écran, puis le code-barres de la navette correspondante).
- Poursuivre avec l'étape 5.

Incubation de lyse dans l'instrument

- Installer les navettes et les peignes d'aspiration, (scanner d'abord le code-barres de la position (A, B ou C) ou sélectionner la position à l'écran, puis le code-barres de la navette correspondante). Imprimer la liste de chargement.
- Récupérer les navettes. Sous une enceinte ESB, distribuer le volume d'échantillon requis (tableau 1) directement dans celle-ci.
- Remettre les navettes à leur position initiale dans l'appareil (scanner d'abord le code-barres de la position (A, B ou C) ou sélectionner la position à l'écran, puis le code-barres de la navette correspondante). Fermer le couvercle de

l'instrument et demander à l'instrument de distribuer automatiquement le tampon de lyse (2 ml) en cliquant sur l'icône **Dispense lysis**.

- L'incubation pour la lyse démarre automatiquement et le temps d'incubation est fixé par le protocole d'extraction. Le décompte du temps est visible à l'écran.
 - Lorsque le temps d'incubation de la lyse est terminé, le logiciel indique que l'étape est terminée et permet de poursuivre avec l'étape 5.
5. Préparation de la silice. Le fabricant fournit des tubes de 1,2 ml. Donc, à l'ouverture d'un nouveau tube, vortexer le tube original pendant 15 secondes. Prélever 600 µl et transférer dans un nouveau tube sarstedt. Apposer un «X» sur le bouchon du tube original s'il n'est pas reconstitué avec de l'eau immédiatement. Toujours utiliser l'aliquot en premier.

À l'aide de la pipette programmable BIOHIT dédiée (programme P1), reconstituer un tube (ou l'aliquot) contenant 600 µl de silice magnétique avec 550 µl d'eau DEPC par série de huit (8) échantillons, puis vortexer pendant 15 secondes.

Note: La préparation eau-silice contient suffisamment de réactifs pour 8 échantillons. Toutefois, si moins de 8 échantillons sont traités, conserver la silice non-utilisée. Inscrire sur le tube la date de reconstitution et le nombre de réaction utilisé, et remettre dans la boîte au réfrigérateur. En période de grande utilisation de l'appareil, il est également possible de préparer une grande quantité de silice. Il suffit de jumeler plusieurs tubes de silice dans un contenant (ex. Corning 50ml) et d'ajouter le volume d'eau correspondant, soit 1,1 mL par tube de silice utilisé. Après reconstitution, le tube peut être conservé un maximum de 14 jours. Pour utiliser un tube déjà reconstitué, vortexer 15 secondes avant le pipetage et inscrire les informations appropriées au RE-BM-182.

6. Distribuer 125 µl de silice magnétique reconstituée dans des cupules en rangée de 8 en utilisant la pipette BIOHIT, programme P2.
7. Lorsque la lyse des échantillons est complétée, distribuer 100 µl de silice magnétique reconstituée dans les navettes en utilisant la pipette BIOHIT, programme P3.
8. Lancer la série en cliquant sur le bouton Démarrer (triangle vert). Vous êtes sur le point de démarrer la série..... Répondre OUI.
9. S'assurer d'être près de l'extracteur lorsque la méthode se termine afin de récupérer le plus rapidement possible les acides nucléiques. Sous l'enceinte d'une ESB, transférer les éluats dans des tubes de collection adéquats en évitant de toucher à la pastille de silice. Identifier ces tubes avec le numéro d'extraction, le numéro de laboratoire, la date d'extraction et le virus associé.
10. Imprimer le rapport (icône avec la loupe).

11. Les résultats de la série sont en cours d'impression. Marquer cette série comme **ARCHIVÉE**. Répondre **OUI**.
12. Si nécessaire, vidanger le réservoir des déchets et faire les maintenances d'usage.

Conserver les préparations d'acides nucléiques à court terme à une température entre 2 et 8°C et à long terme à $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

X. RÉSULTATS

Lorsqu'une méthode se termine un rapport est créé automatiquement avec les données relevant de l'extraction effectuée. Faire imprimer celui-ci.

XI. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Joindre le rapport au registre RE-BM-182. Remettre les feuilles de travail dans la chemise appropriée du classeur désigné.

XII. RÉFÉRENCES

Grille, NucliSens-easyMAG liste de contrôle de maintenance par l'utilisateur, Révision 3

bioMérieux, NucliSENS® easyMAG®, Manuel de l'utilisateur V2.0 REF : 280163

bioMérieux, NucliSENS® easyMAG™ User Manual V2.0 REF : 280163

bioMérieux, NucliSENS® easyMAG™ 2.0.1 Guide

Quick user guide card easyMAG V2.0 On / Off board lysis

Guide simplifié d'utilisation - Logiciel NucliSens easyMAG® V2.0

bioMérieux Pre-extraction Protocol Serum (e.g. HBV DNA application)
BTL034472 release 2.0

XIII. DOCUMENTS ASSOCIÉS

AI-BMRC-020 Protéïnase K – Tris-HCl

AI-BM-067 Aide-mémoire d'utilisation du NucliSens – easyMAG de BioMérieux

RE-BM-182 Extractions d'acides nucléiques sur le NucliSENS –
easyMAG/eMAG®

RE-BM-243 Relevé de maintenance de l'extracteur NucliSENS® - easyMAG

COPIE DE COURTOISIE

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

Annexe 1

Fermeture de l'appareil NucliSENS® - easyMAG et de l'ordinateur

- **Fermeture**

1. Appuyer sur la clé en bas de l'écran et choisir la fonction que vous souhaitez exécuter, appuyer sur **Quitter**. Cliquez sur **OK** pour fermer l'application.
2. Fermer le système d'exploitation, appuyer sur **OK** et **attendre la fermeture de l'ordinateur**. Après un certain délai l'écran devient noir.
3. Attendre que le voyant de l'appareil NucliSENS® - easyMAG devienne **fixe et rouge** et fermer l'appareil en appuyant sur le bouton situé à droite vers l'arrière.

- **Ouverture**

1. Allumer l'ordinateur et l'écran tactile.
2. Ouvrir l'appareil NucliSENS® - easyMAG en appuyant sur le bouton situé à droite vers l'arrière et attendre que le voyant de l'appareil devienne **vert**.
3. Entrer les codes d'accès : nom de l'utilisateur :
mot de passe :
4. Appuyer sur Ouvrir session.

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

Annexe 2

Filtration sur colonnes QIAshredder

1. Centrifuger brièvement l'échantillon.
2. Pipeter ou aspirer à l'aide d'une pipette de transfert environ 300 µl d'échantillon et déposer ce volume sur une colonne QIAshredder. Au besoin ajouter du milieu de transport MEM ou équivalent.
3. Centrifuger la colonne pendant 1 minute à 14 000 rpm à la T° ambiante.
4. Récupérer le filtrat dans un tube de type Sarstedt de 2.0 ml pré-identifié et le conserver aux températures adéquates.

Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail.

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Extractions automatisées d'acides nucléiques - plateforme eMAG® de BioMérieux

Noms

Auteur(s) : Joel Ménard

Réviser(s) : Lyne Désautels

Approbateur : Hugues Charest

Coordonnateur du document : Lyne Désautels

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace le document PR-BM-096 version 01. Les modifications apportées sont décrites au tableau ci-dessous.

Section	Modification	Justification
Tout le texte	Changement du RE-BM-182 pour le RE-BM-182.	Un seul registre universel pour l'utilisation du EMAG et/ou easyMAG.
IX. Exposé de la procédure	Ajout d'extraire avec distribution de la silice par l'instrument ou par l'utilisateur. Ajout de 2 façons pour la fabrication de la silice.	2 possibilités possibles.
Annexe 1	Ajout de l'information du 2 ^e EMAG.	Nouveau robot en utilisation au LSPQ.

II. CHAMPS D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire

III. PRINCIPE

La plate-forme eMAG est conçue pour l'extraction automatisée (purification et concentration) d'acides nucléiques (ARN/ADN) totaux à partir d'échantillons biologiques.

Cette plateforme possède deux modules distincts qui permettent chacune d'extraire jusqu'à 24 échantillons/contrôles simultanément. Les réactifs sont utilisés selon les recommandations et protocoles fournis par le manufacturier.

IV. SPÉCIMENS

- Spécimen respiratoire tel que : écouvillonnage de gorge, de nez, sécrétions (aspiration, expectoration) nasopharyngées ou endotrachéales, lavage broncho-alvéolaire. Ces types d'échantillons sont habituellement conservés dans un milieu de transport viral tamponné.
- Surnageant de culture virale et bactérienne.
- Selle, sang, sérum, plasma-EDTA, plasma-ACD (acide citrique-dextrose).
- Écouvillon anal, rectal ou extra-génital
- Eau (prélèvement environnemental)

Cette liste n'est pas exhaustive.

Au besoin le volume d'échantillon initial peut être augmenté en ajoutant du milieu de transport viral, de la saline ou du MEM. Il faut toutefois tenir compte de cette dilution lors de l'interprétation du résultat. La dilution d'un échantillon clinique avant l'extraction doit être documentée sur les registres de travail.

V. MATÉRIEL REQUIS

Équipement

- Instrument NucliSENS™ - eMAG de bioMérieux
- Logiciel NucliSENS eMAG
- Agitateur-mélangeur à Vortex
- Récipients pour matériel contaminé de type Conocup
- Microcentrifugeuse
- Micropipettes de 2 à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles et certifiés exempts de RNAses
- Portoir de navettes métallique
- NucliSENS - easyMAG Disposables (navettes et peignes d'aspiration)
- EMAG® Tips 1000µL (cat 418922)
- EMAG® Tips Waste Bag (cat 422140)
- Minuterie
- Bloc chauffant
- Thermomètre calibré pour une lecture de 55°C
- Thermomètre calibré pour température pièce (15-25°C)
- Colonnes QIAshredder (QIAGEN # cat 79656)
- Pipettes de transfert
- Tubes de type Sarstedt (1,5 ml et 2,0 ml) stériles
- Tubes de type Corning (50 ml)
- Tubes de collection ou équivalent pour la conservation des acides nucléiques et lisières de bouchons associées
- Nettoyant NOVUS (Plastic Clean & shine)
- Alcool 70%
- Eau purifiée type II

Réactifs

- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 1
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 2
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 3
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica
- Protéinase K -Tris-HCl (AI-BMRC-020)
- MEM (Minimum Essential Medium 1X) ou équivalent, si nécessaire
- Contrôle interne MS2 de la trousse NxTAG® Respiratory Pathogen Panel de Luminex (PR-BM-119), le cas échéant
- Contrôle interne MS2 pour l'analyse Multiplex GI (PR-BM-130), le cas échéant

VI. MAINTENANCE

Compléter le registre de maintenance RE-BM-286.

Les recommandations du manufacturier sont les suivantes :

A. Inspection quotidienne (à chaque jour d'utilisation) :

- Inspecter l'instrument pour toute fuite et nettoyer au besoin.

B. Inspections et entretiens hebdomadaires (ou première utilisation de la semaine):

- Éteindre l'ordinateur et l'instrument (Annexe 1). Toujours s'assurer d'ouvrir les portes de la zone de travail et des compartiments des réactifs avant.
- Nettoyer les vitres de l'instrument avec le nettoyant NOVUS.
- Essuyer et nettoyer l'extérieur et le pourtour intérieur de l'instrument à l'alcool 70%.
- Nettoyer la zone des réactifs (c'est-à-dire, la zone avec les 4 bouteilles).
- Vidanger le conteneur de déchets liquides.
- Vérifier les conteneurs de déchets solides et les vider au besoin.
- Vérifier le filtre de la prise d'air des flacons de réactifs. Si nécessaire le remplacer. Pour le retirer il faut piquer le filtre avec un objet pointu.
- Vérifier si les joints d'étanchéité (O-rings) sont bien en place et rechercher la présence de cristaux sur les joints toriques.
- Examiner les embouts de distribution. Si nécessaire nettoyer les deux embouts de distribution des réactifs, ils sont situés vers l'extérieur de l'appareil. Éliminer les cristaux avec un coton-tige trempé dans un tube d'eau DEPC. Nettoyer avec un mouvement vers le bas.
- Rechercher la présence de cristaux de guanidine sur les attaches et les bouchons des réactifs, ainsi que sur les joints des peignes d'aspiration. Si nécessaire, éliminer les cristaux avec un coton-tige trempé dans un tube d'eau DEPC. Changer de coton-tige à chaque buse.
- Rallumer le système après avoir remis les différents tiroirs en place.
- Effectuer une réinitialisation de la carte mère de l'instrument (Voir Annexe 2).

- Effectuer le protocole de maintenance «Nettoyage avec du tampon d'extraction 3» pour chacune des sections.
 1. Sélectionner l'onglet Maintenance, puis Maintenance préventive
 2. Choisir Nettoyage avec du tampon d'extraction 3
 3. Utiliser les navettes dédiées
 4. Démarrer le protocole en appuyant sur le bouton correspondant au module désiré dans le coin inférieur droit. Le nettoyage prend environ 10 minutes pour chaque section.

C. Inspections et entretiens occasionnels:

Des maintenances périodiques sont effectuées par bioMérieux selon le contrat de service acheté.

VII. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Sauf exception, chaque série d'extraction doit inclure une série de témoins comprenant au moins un contrôle négatif et un contrôle positif. Consulter les procédures techniques des pathogènes recherchés pour le choix des contrôles.

Par exemple, pour les échantillons testés à l'aide de la trousse NxTag RPP de Luminex ou pour les panels des virus entériques, il n'y a pas de contrôle positif à extraire. Toutefois, la trousse inclut un contrôle interne (solution du phage MS2) qui doit être ajouté à chaque échantillon avant l'étape de l'extraction des acides nucléiques ainsi qu'un contrôle négatif d'extraction.

- Compléter le registre RE-BM-182 « Extractions d'acides nucléiques sur le NucliSens –easyMAG /EMAG».
- Les tampons NucliSens® easyMAG® Lysis Buffer, Extraction Buffer 1, Extraction Buffer 2 et Extraction Buffer 3 doivent être laissés à bord jusqu'à épuisement, ou pour un maximum de 30 jours suivant l'ouverture du contenant.

Note : Le logiciel calcule automatiquement le nombre de jours restants pour chaque réactif.
- La réserve de tampon NucliSens® easyMAG® Extraction Buffer 3 est entreposée entre 2 et 8°C.
- La réserve de silice NucliSens® easyMAG® Magnetic Silica est entreposée entre 2 et 8°C.
- Lors de la qualification d'un nouveau réactif; compléter le fichier Excel « BM Réception-Qualification ».

VIII. PRÉCAUTIONS SPÉCIALES

- Les tampons NucliSens® easyMAG® Lysis Buffer et NucliSens® easyMAG® Extraction Buffer 1 (bouteilles à bouchons rouges) contiennent du thiocyanate de guanidine. Récupérer les réactifs du conteneur à déchets et les transvider dans un récipient identifié et prévu à cet effet. Le secteur Physico-chimie est responsable de l'élimination de ces déchets.
- Lors du remplacement des bouteilles de tampons, éviter de mouiller les filtres d'air sur les bouchons.
- Les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (Annexe 3). Du milieu de culture viral peut être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail.** Une centrifugeuse avec couvercle étanche est utilisée pour la centrifugation des échantillons à l'intérieure d'une ESB.
- Toutes les manipulations d'échantillons sont effectuées dans une enceinte de sécurité biologique (ESB) selon les pratiques prévues au document PR-BS-002.

IX. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

N.B : Laisser les portes de l'appareil fermées dans les moments d'attente pour éviter la contamination.

- Vérifier le statut des réactifs, pour chacune des 4 bouteilles. Aller dans la zone «Flacons de réactifs» et cliquer sur «Charger». Sélectionner respectivement chacune des positions des réactifs, puis scanner le code à barres sur la bouteille correspondante. Cliquer sur «Appliquer» après la lecture de chaque bouteille. Les bouteilles restent à bord de l'appareil jusqu'à l'épuisement des réactifs ou pour un maximum de **30 jours**.
- Vérifier le statut des embouts. Aller dans la zone des embouts et cliquer sur «Charger». Insérer lentement le tiroir contenant les boîtes d'embouts. Choisir «Boîte Pleine» s'il s'agit d'une boîte neuve sinon inscrire la position du premier embout. Le logiciel calcule automatique le nombre d'embouts restants.
- Créer la liste de travail et définir la demande d'extraction. Consulter l'aide-mémoire AI-BM-090 pour toute information relative à la programmation de l'appareil.
- Créer la liste des échantillons :
 1. Cliquer sur l'icône «Liste des demandes»

2. Dans la section «Demande d'extraction», inscrire ou sélectionner les critères dans tous les champs. :
 - ID : entrer ou scanner le numéro de l'échantillon ou contrôle
 - Matrice, Méthodes d'extraction
 - Les champs : volume d'entrée, de silice et de sortie sont complétés automatiquement en lien avec la méthode d'extraction. Si nécessaire, ceux-ci peuvent être modifiés (Voir AI-BM-090)
 3. Sauvegarder en cliquant sur l'icône disquette ou en appuyant sur Entrée
- Créer la série :
4. Cliquer sur l'icône «Préparation entrées».
 5. Dans le champ ID (coin inférieur gauche) sous l'onglet Segment/Navette, saisir le code-barre de la navette à être utilisé (ex. Z108ABERE).
 6. Sélectionner de une à huit demandes d'extraction de la section du haut et les transférer sur la navette sélectionnée en appuyant sur la flèche vers le bas.
Note : Pour faciliter la visualisation des demandes, il peut être utile de classer celles-ci par date de modification. S'assurer de respecter l'ordre défini sur le RE-BM-182.
 7. Pour ajouter une nouvelle navette, appuyer sur le «+» (coin inférieur droit) et répéter les étapes 5 et 6.
- Aller dans la section «Chargement et Séries». S'assurer de sélectionner la bonne section de l'appareil à être utilisé.

Incubation de lyse hors instrument (lyse manuelle)

- Ouvrir la porte de la section désirée.
- Installer les navettes et les peignes d'aspiration. Dès la fermeture de la porte, l'appareil lit les codes-barres navettes automatiquement et associe la liste de travail correspondante.
- Procéder avec la demande automatique de distribution de tampon de lyse (2 ml) en cliquant sur l'icône du côté droit avec la flèche inscrit «**Lyse**». À la fin du processus, attendre l'**arrêt** complet de la section avant de poursuivre.
- Note** : L'ajout de MS2 (contrôle interne), pour les trousse de pathogènes respiratoires ou de multiplex entériques se fait **avant** la distribution de la lyse.
- Récupérer les navettes sur le portoir approprié. Sous une ESB, distribuer le volume d'échantillon requis (AI-BM-090) et mélanger très légèrement par pipetage répétitif, en évitant la formation de bulles et d'aérosols.
- Incuber à température ambiante pendant environ 10 minutes. Noter la température et l'heure sur le registre RE-BM-182.

- Préparation de la silice. Le fabricant fournit des tubes de 1,2 ml. Vortexer le tube original pendant 15 secondes.
- **Ajout par l'appareil** : Méthodes d'extraction **Tout_C30v_off_Ves_SB** et **GE_C51v_off_Ves_GE** : ajouter le tube en position 1 sur le tiroir vert associé aux réactifs. Normalement le code à barres est automatiquement détecté par l'appareil pendant le chargement, un point bleu en position 1 apparaît. Grâce au code à barres sur le tube, le lot et la date de péremption sont automatiquement inscrits à la bonne position. S'il y a présence d'un triangle avec un point d'exclamation, entrer les informations manuellement, sélectionner la position du réactif à l'écran. Dans la nouvelle fenêtre, sélectionner «SILICA» dans le menu déroulant et inscrire le lot et la date d'expiration correspondant manuellement ou en utilisant le code barre de la boîte de silice.

IMPORTANT: Pour une extraction de 24 échantillons, il est nécessaire d'ajouter un deuxième tube de silice magnétique. Toujours vérifier à l'écran la quantité de silice nécessaire pour le protocole d'extraction.

- **Ajout manuel** : Méthodes d'extraction **Tou2_C30v_off_Ves_SB** et **GE2_C51v_off_Ves_GE** : Le fabricant fournit des tubes de 1,2 ml. Donc, à l'ouverture d'un nouveau tube, vortexer le tube original pendant 15 secondes. Prélever 600 µl et transférer dans un nouveau tube sarstedt. Apposer un «X» sur le bouchon du tube original s'il n'est pas reconstitué avec de l'eau immédiatement. Toujours utiliser l'aliquot en premier.

À l'aide de la pipette programmable BIOHIT dédiée (programme P1), reconstituer un tube (ou l'aliquot) contenant 600 µl de silice magnétique avec 550 µl d'eau DEPC par série de huit (8) échantillons, puis vortexer pendant 15 secondes.

Note: La préparation eau-silice contient suffisamment de réactifs pour 8 échantillons. Toutefois, si moins de 8 échantillons sont traités, conserver la silice non-utilisée. Inscrire sur le tube la date de reconstitution et le nombre de réaction utilisé, et remettre dans la boîte au réfrigérateur. En période de grande utilisation de l'appareil, il est également possible de préparer une grande quantité de silice. Il suffit de jumeler plusieurs tubes de silice dans un contenant (ex. Corning 50ml) et d'ajouter le volume d'eau correspondant, soit 1,1 mL par tube de silice utilisé. Après reconstitution, le tube peut être conservé un maximum de 14 jours. Pour utiliser un tube déjà reconstitué, vortexer 15 secondes avant le pipetage et inscrire les informations appropriées au RE-BM-182.

- Distribuer 125 µl de silice magnétique reconstituée dans des cupules en rangée de 8 en utilisant la pipette BIOHIT, programme P2.
- Lorsque la lyse des échantillons est complétée, distribuer 100 µl de silice magnétique reconstituée dans les navettes en utilisant la pipette BIOHIT, programme P3.

- Lorsque l'incubation est terminée, remettre les navettes à leur position initiale dans l'appareil. (L'appareil vérifie les codes-barres des navettes pour s'assurer du bon positionnement.)
- Portoir des embouts : Si dans la section «Embouts de pipetage», on note la présence d'un point d'interrogation, appuyer sur charger. Ouvrir le tiroir, observer la quantité d'embouts restants et refermer délicatement le tiroir pour permettre la lecture du code-barre. Vérifier ou inscrire la position de premier embout ainsi que le nombre total d'embouts présents (Voir schéma en Annexe 4 ou sur l'instrument).
- Lancer la série en cliquant sur le bouton «Démarrer» (triangle à droite).
- S'assurer d'être près de l'extracteur lorsque la méthode se termine afin de récupérer le plus rapidement possible les acides nucléiques. Sous une ESB ou une enceinte close, transférer les éluats dans des tubes de collection adéquats en évitant de toucher à la pastille de silice. Identifier ces tubes avec le numéro de position d'extraction, le numéro de laboratoire, la date d'extraction et le pathogène associé.
- Retirer le ou les tubes de silice de l'appareil. Jeter les tubes vides et conserver ceux avec un volume restant pour les prochaines extractions.
- Visualiser le rapport à l'écran de l'ordinateur du eMAG. Cocher la section «Épreuve Valide» du RE-BM-182
- Si nécessaire, faire les maintenances d'usage et vidanger le réservoir des déchets au minimum une fois par semaine.

Conserver les préparations d'acides nucléiques pour usage dans la même journée à une température entre 2 et 8°C et à long terme à $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

X. RÉSULTATS

Lorsqu'une méthode se termine, un rapport est automatiquement créé avec les données relevant de l'extraction effectuée. Cliquer sur l'icône «Rapports», rechercher avec la date le rapport désiré. Sélectionner celui-ci, appuyer sur imprimer puis sur l'option PDF. Vérifier l'absence de code d'erreur ou d'autre problème durant l'extraction. Enregistrer le rapport en format pdf dans le dossier S:\partage\Biologie moléculaire\leMAG\Rapport.

XI. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Joindre le registre RE-BM-182 avec les autres feuilles de travail dans la chemise associée du classeur désigné.

XII. RÉFÉRENCES

bioMérieux, EMAG®, Manuel de l'utilisateur V. 161150-643-C-fr-2018-02 REF : 161150-1163

bioMérieux, User Management V. 4501-2207-C-fr-2016-07 REF : 161150-840

bioMérieux, Méthodes d'extraction V. 161150-730-B-fr-2017-05 REF: 116150-1002

Guide simplifié d'utilisation EMAG® version SP2_Fr_A_septembre 2018

bioMérieux Pre-extraction Protocol Serum (e.g. HBV DNA application) BTL034472 release 2.0

XIII. DOCUMENTS ASSOCIÉS

AI-BMRC-020 Protéinase K – Tris-HCl

AI-BM-090 Aide-mémoire d'utilisation du NucliSens – eMAG de BioMérieux

RE-BM-182 Extractions d'acides nucléiques sur le NucliSENS – easyMAG/eMAG®

RE-BM-286 Relevé de maintenance de l'extracteur eMAG®

Annexe 1

Fermeture de l'appareil eMAG® et de l'ordinateur

- **Fermeture**

1. Sur le logiciel d'utilisation eMAG®, cliquer sur l'icône Maintenance, puis sélectionner Maintenance corrective. Appuyer sur Éteindre instrument suivi de Arrêt instrument.
2. Appuyer sur la clé dans le coin inférieur gauche pour terminer la session, Ensuite fermer le système d'exploitation, éteindre l'ordinateur et l'écran tactile.
3. Attendre que les voyants de l'appareil eMAG® devienne **fixe et rouge** et fermer l'appareil en appuyant sur le bouton situé à droite vers l'arrière.

- **Ouverture**

1. Allumer l'ordinateur et l'écran tactile.
2. Ouvrir l'appareil eMAG® en appuyant sur le bouton situé à droite vers l'arrière et attendre que les voyant de l'appareil deviennent **vert**.
3. Ouvrir la session Windows :
nom de l'utilisateur : ██████████
Mot de passe : ██████████
4. Cliquer sur l'icône EMAG™
5. Entrer les codes d'accès : eMAG 10026 nom de l'utilisateur : ██████
mot de passe : ██████

eMAG 09577 nom de l'utilisateur : ██████
mot de passe : ██████

Note : ██████████ peut changer car pour des raisons de sécurité, le mot de passe doit être modifié régulièrement.

Annexe 2

Procédure de Réinitialisation eMAG®

1. Sur le logiciel d'utilisation eMAG™ cliquer sur l'icône Maintenance, puis sélectionner Maintenance corrective. Ensuite, appuyer sur Initialiser composant.
2. Choisir l'initialisation désirée parmi les quatre choix disponibles : Initialiser la section de gauche, de droite ou les deux en même temps. De plus il y a la possibilité de réinitialisation de la carte mère. Il s'agit d'un redémarrage système complet (effectué lors de la maintenance hebdomadaire).
3. Une fois la réinitialisation lancée, attendre que les voyants de l'appareil eMAG™ devienne **fixe et vert** pour poursuivre.

Annexe 3

Filtration sur colonnes QIAshredder

4. Centrifuger brièvement l'échantillon.
5. Pipeter ou aspirer à l'aide d'une pipette de transfert environ 300 µl d'échantillon et déposer ce volume sur une colonne QIAshredder. Au besoin ajouter du milieu de transport MEM ou équivalent.
6. Centrifuger la colonne pendant 1 minute à 14 000 rpm à la T° ambiante.
7. Récupérer le filtrat dans un tube de type Sarstedt de 2.0 ml pré-identifié et le conserver aux températures adéquates.

Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail.

Annexe 4

Aide-mémoire Embouts eMAG

		1er tips disponible								nombre de tips restants								
code barre section gauche	1	1	2	3	4	5	6	7	8	96	95	94	93	92	91	90	89	1
	2	9	10	11	12	13	14	15	16	88	87	86	85	84	83	82	81	2
	3	17	18	19	20	21	22	23	24	80	79	78	77	76	75	74	73	3
	4	25	26	27	28	29	30	31	32	72	71	70	69	68	67	66	65	4
	5	33	34	35	36	37	38	39	40	64	63	62	61	60	59	58	57	5
	6	41	42	43	44	45	46	47	48	56	55	54	53	52	51	50	49	6
	7	49	50	51	52	53	54	55	56	48	47	46	45	44	43	42	41	7
	8	57	58	59	60	61	62	63	64	40	39	38	37	36	35	34	33	8
	9	65	66	67	68	69	70	71	72	32	31	30	29	28	27	26	25	9
	10	73	74	75	76	77	78	79	80	24	23	22	21	20	19	18	17	10
	11	81	82	83	84	85	86	87	88	16	15	14	13	12	11	10	9	11
	12	89	90	91	92	93	94	95	96	8	7	6	5	4	3	2	1	12

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Utilisation des appareils QuantStudio™3 et QuantStudio™5 de la compagnie Thermo Fisher Scientific

	Noms
Auteur(s) :	<u>Hugues Charest</u> _____ _____
Réviser(s) :	<u>Lyne Désautels</u> <u>Christine Martineau</u> _____ _____
Approbateur :	<u>Hugues Charest</u> _____
Coordonnateur du document :	<u>Lyne Désautels</u> _____

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace le document PR-BM-098 version 01.

Les modifications apportées sont décrites au tableau ci-dessous.

Section	Modification	Justification
Titre et dans l'ensemble du texte	Ajout de l'appareil Quantstudio 5.	Nouvel appareil dont le fonctionnement est identique à celui du Quantstudio 3; un même guide convient pour les 2 appareils.
IV. Calibration	Ajout de la calibration de type 'Dye'.	Manquante dans la version précédente.
VIII. Exposé de la procédure	Ajout d'instruction pour la sauvegarde des résultats en IDBM. Ajout d'instructions pour l'ajustement du Baseline Ajout d'instructions pour l'utilisation de l'interface par le secteur BM.	L'appareil QS5 est utilisé par ce secteur. Manquantes dans la version précédente. Nouvelle étape à faire en suite à l'implantation du SGIL.

II. OBJECTIFS

Fournir l'essentiel des informations nécessaires au paramétrage du logiciel, à la configuration d'un essai, à la production d'un rapport d'analyse et à la calibration de l'appareil.

III. CHAMPS D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel ayant à réaliser des analyses sur les appareils de PCR en temps réel QuantStudio™3 et QuantStudio™5.

IV. MATÉRIEL REQUIS

- Micropipettes à volume variable et embouts tamponnés stériles correspondants
- Centrifugeuse avec adaptateur pour plaques
- Agitateur-mélangeur à vortex
- QuantStudio3 de Thermo Fisher
- Plaque de 96 puits MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode

- Ruban optique Optical Adhesive Covers de Thermo Fischer (No cat : 436095A)
- Spatule pour sceller la plaque

Calibrations (produits de Thermo Fischer):

- 96-Well Fast Region of Interest (ROI) and Background Plates (2 plates); n° cat: 4432426
- QuantStudio 3 or 5 10-Dye Spectral Calibration Kit; n° cat : 4432426
- 96Well Fast TaqMan RNase P Instrument Verification Plate; n° cat: 4351979

Nettoyage du bloc d'amplification.

- Coton-tige stériles
- Eau distillée, solution d'éthanol 95% et d'eau de javel 10%, si nécessaire.

V. ÉQUIPEMENT

L'appareil QuantStudio™3 est un appareil de PCR en temps réel avec bloc 96 puits possédant quatre jeux de filtres de couleurs ayant des gammes d'émissions de longueur d'onde entre 500 et 640 nm. Les 4 canaux disponibles permettent respectivement la détection des fluorophores FAM/SYBR Green, VIC/JOE/HEX/TET, ABY/NED/TAMRA/Cy3, ROX/Texas Red/JUN. Un maximum de 4 cibles dont les fluorophores sont détectés dans 4 canaux différents peut être détecté simultanément par l'appareil dans un même puits. Il est possible d'utiliser un des canaux pour la détection d'un fluorophore (généralement le ROX) ajouté au mélange réactionnel et utilisé comme référence passive (facultatif). L'appareil permet l'utilisation de paramètres de cyclage standards ou rapides.

L'appareil QuantStudio™5 est identique au QuantStudio™3 mais possède 6 jeux de filtres de couleurs ayant des gammes de détection de longueur d'onde entre 500 et 660 nm. Les 6 canaux disponibles permettent respectivement la détection des fluorophores FAM/SYBR Green, VIC/JOE/HEX/TET, ABY/NED/TAMRA/Cy3, ROX/Texas Red/JUN, Cy5/Mustang Purple et Cy5.5. Le Mustang Purple peut être utilisé en remplacement du ROX comme référence passive (facultatif). Il est à noter que le logiciel d'utilisation est le même pour les 2 appareils.

Pour des rendements optimums, ne pas utiliser ces appareils lorsque la température ambiante est inférieure à 15°C ou supérieure à 30°C, ou si le taux d'humidité est supérieur à 80%. Afin de permettre un refroidissement adéquat, laisser un minimum de 6 pouces d'espace entre l'appareil et le mur à l'arrière. Il ne doit pas être installé sur un comptoir où des instruments génèrent des vibrations, comme des centrifugeuses ou des pompes.

Nettoyage externe : Éviter de renverser du liquide dans le thermocycleur ou le module optique : dans de telles circonstances, nettoyer avec de l'eau et un chiffon pour tâches délicates (non pelucheux). Nettoyer au besoin le plateau sur lequel la plaque est déposée (puits et encadrement).

Filtres optiques et lampes : il n'est pas possible de modifier ou d'échanger des filtres pour l'émission de lumière ou la capture de fluorescence ; l'émission de lumière est assurée par une LED blanche.

VI. CALIBRATIONS ET TESTS DE PERFORMANCE

A) Calibrations

La calibration est nécessaire pour assurer la qualité des lectures obtenues. La recommandation du fabricant est de l'effectuer aux deux ans, ou après un déménagement de l'instrument. Toutefois, elle peut aussi être effectuée à tout moment, afin de s'assurer de la performance de l'appareil. Un rappel pour une calibration peut être programmé en utilisant l'outil dédié à cet effet dans 'Settings/Maintenance and Service/Calibrations/History and Reminders. À cet emplacement peut également être consulté l'historique des calibrations.

Préparation des plaques de calibration :

- Dégeler les plaques dans leur emballage pendant 30 minutes à T° pièce.
- Retirer les plaques de leur emballage (conserver les emballages). **Ne pas retirer la pellicule de plastique qui scelle la plaque.**
- Vortexer pendant 5 secondes, puis centrifuger 2 min à 750 ou 1000 g.
- S'assurer que tout le matériel est au fond des puits, sinon, centrifuger de nouveau.

Les calibrations 'ROI\Uniformity' et 'Background' s'effectuent en séquence :

1) Calibration 'ROI\Uniformity'

- Sélectionner le programme en utilisant le chemin suivant : 'Settings/Maintenance and Service/Calibrations/ROI and Uniformity'
- Insérer la plaque dans l'appareil (le code à barres à l'avant de l'appareil) et refermer le tiroir.
- Lorsque la calibration est complétée un message à cet effet apparaît à l'écran. Lorsque le résultat est probant ('Passed'), cliquer sur 'Next' pour passer à l'étape suivante. Si le résultat est 'Failed', consulter la section 'Troubleshoot Calibration Failure' et la coordinatrice technique ou le responsable d'activité.
- Retirer la plaque, la remettre dans son emballage et la retourner dans le congélateur (entre -15 et -25 °C).

2) Calibration 'Background'

- Le programme de cette calibration démarre automatiquement après que la précédente soit terminée.
- Lorsqu'elle se termine, cliquer sur 'Details' qui apparaît alors à l'écran; il est dès lors possible de naviguer à travers les écrans de résultats des calibrations – consulter le guide d'utilisation de l'appareil (pages 46 et 47) pour des informations relatives à ces données.

- Cliquer sur 'Accept Results' ou 'Reject Results' dans la section 'Calibration status' apparaissant à l'écran, selon l'appréciation des résultats obtenus.

Une calibration de type 'Dye' peut être effectuée afin de calibrer les fluorophores de base disponibles sur l'instrument :

- Sélectionner le programme en utilisant le chemin suivant : 'Settings/Maintenance and Service/Calibrations/Dye'
- Choisir la série de fluorophores à calibrer et appuyer sur 'Next'
- Insérer la plaque dans l'appareil (le code à barres à l'avant de l'appareil) et refermer le tiroir.
- Lorsque la calibration est complétée un message à cet effet apparaît à l'écran. Lorsque le résultat est probant ('Passed'), cliquer sur 'Next' pour passer à l'étape suivante. Si le résultat est 'Failed', consulter la section 'Troubleshoot Calibration Failure' et la coordinatrice technique ou le responsable d'activité.
- Retirer la plaque, la remettre dans son emballage et la retourner dans le congélateur (entre -15 et -25 °C).

Il est aussi possible de calibrer l'appareil pour la détection de fluorophores qui ne sont initialement pas disponibles. Cette procédure est décrite aux pages 54 à 59 du guide du fabricant.

B) Vérification de la performance

Elle s'effectue en utilisant une plaque 96 puits achetée chez le fabricant. Cette plaque contient des quantités connues de copies génomiques de la cible RNase P (de 1250 à 2000 copies) disposées dans la plaque selon un schéma connu, ainsi que tous les réactifs nécessaires à l'amplification et la détection.

- Sélectionner le programme en utilisant le chemin suivant : 'Settings/Maintenance and Service/Calibrations/RNase P Verification'
- Insérer la plaque dans l'appareil (le code à barres à l'avant de l'appareil), refermer le tiroir et cliquer sur 'Start'.
- Lorsque la calibration est complétée un message à cet effet apparaît à l'écran, cliquer sur 'View Results'. Si le résultat est 'Failed', consulter la section 'Troubleshoot verification failure' à la page 53 du manuel d'utilisation et la coordinatrice technique ou le responsable d'activité. Lorsque le résultat est probant, cliquer sur ('Accept Results'), sinon cliquer sur 'Reject Results' pour effacer les résultats.
- Jeter la plaque.

Identification d'une contamination du bloc d'amplification ou d'une plaque 96 puits utilisée pour une calibration.

Un signal qui excède la limite de fluorescence normale peut indiquer une contamination par des agents tels la poussière, l'encre de marqueurs, du talc

etc. Si des puits n'ont pas passé des étapes de calibration, il est possible d'en détecter les causes de la façon suivante :

- Noter d'abord les puits qui n'ont pas passé le contrôle de la qualité.
- Retirer la plaque de calibration, la retourner (horizontalement) de 180° et la replacer sur le block.
- Recommencer les étapes de calibration ('RIO and Uniformity', et 'Background').
- Si les résultats sont identiques à ceux obtenus dans la calibration précédente, il s'agit d'une contamination des puits : procéder à un nettoyage tel qu'indiqué à la section suivante; si les puits fautifs sont placés à l'image inverse de ceux identifiés lors de la calibration précédente, jeter la plaque et recommencer la calibration à l'aide d'une nouvelle plaque.

Nettoyage du bloc d'amplification :

- Fermer l'appareil et le débrancher la prise de l'UPS.
- Tirer le tiroir pour exposer le bloc d'amplification.
- Pipeter à plusieurs reprises une solution d'eau distillée dans chacun des puits identifiés comme fautifs précédemment; absorber l'excédent avec un coton tige.
- Laisser sécher, refermer le tiroir, remettre sous tension et refaire une calibration 'Background'
- Si la contamination persiste, répéter les dernières étapes cette fois-ci en utilisant une solution d'éthanol 95%, puis rincer avec de l'eau distillée tel que décrit précédemment.
- Si la contamination persiste, nettoyer cette fois avec une solution d'eau de javel 10%, puis rincer avec de l'eau distillée.
- Si le problème persiste, contacter le service technique de la compagnie.

Transport ou stockage de l'appareil :

- Cliquer sur 'Settings/Maintenance and Service/Ship Prep Mode/Next'
- Insérer la plaque 96 puits de l'emballage original (ou une plaque vide), refermer le tiroir et cliquer sur 'Lock Block'
- Fermer l'appareil en utilisant le commutateur situé à l'arrière de l'appareil et débrancher le l'UPS.

VII. PRÉCAUTIONS SPÉCIALES

- La présence de bulles dans les puits nuit à la lecture. Si nécessaire, centrifuger la plaque en utilisant la centrifugeuse à plaques.
- Au besoin, après avoir déposé la plaque sur le plateau du thermocycleur, repasser un chiffon pour tâches délicates sur le scellant afin de s'assurer qu'il soit bien collé ou repasser à l'aide de la spatule.

VIII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

L'appareil doit être allumé en premier. Vérifier que l'écran ne soit pas qu'en veille en le touchant (touchscreen). S'il ne s'éclaire pas immédiatement, allumer l'appareil à l'aide du commutateur situé à l'arrière de l'appareil.

Si nécessaire, démarrer l'ordinateur de traitement. Ignorer les messages durant l'ouverture (en cliquant OK), cliquer sur l'icône 'INSTR-USER' pour débiter une session, inscrire [REDACTED] à la demande du mot de passe, puis cliquer sur l'icône 'QuantStudio Design & Analysis Software' pour démarrer le programme d'analyses.

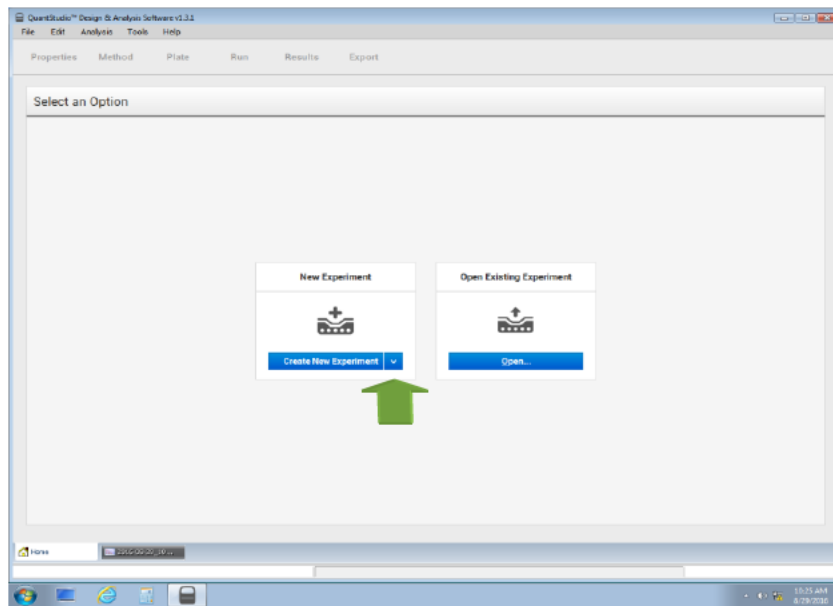
Note : Pour la coordonnatrice (ou la personne mandatée) qui a à ajouter de nouveaux templates ou de faire des modifications aux protocoles existants, l'utilisation du user [REDACTED] et du mot de passe [REDACTED] est nécessaire.

Le logiciel d'application offre des formats adaptés pour plusieurs types d'analyses : établir une courbe standard, déterminer une température de dissociation, génotyper etc. Pour les essais de détection, qui constituent la très grande majorité des analyses effectuées au LSPQ, le type 'standard curve' (courbe standard) est le type de programmation de base adéquat pour développer un gabarit d'analyse.

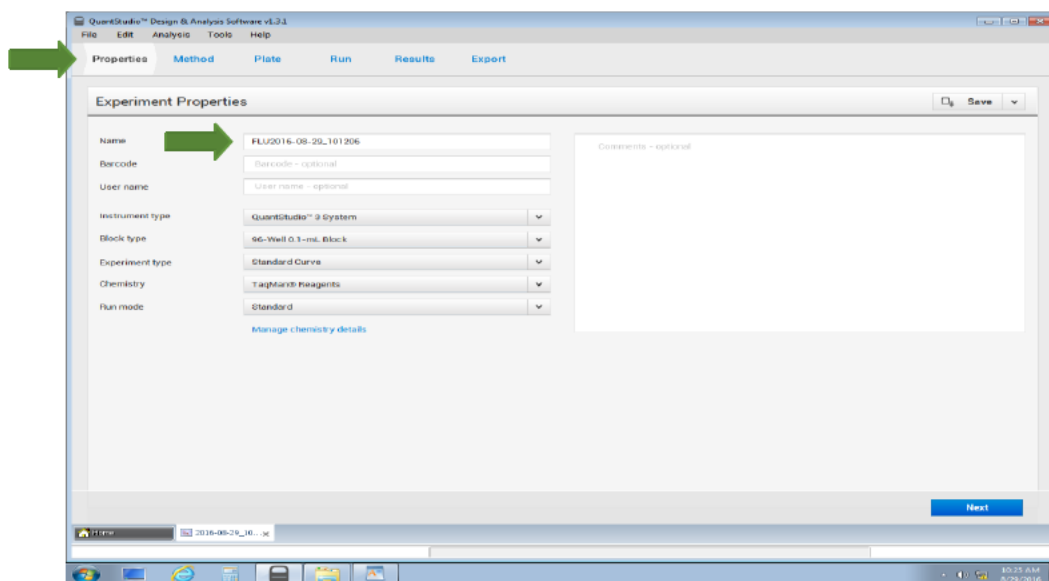
Il est possible d'initier une nouvelle analyse de deux façon, soit en créant un gabarit *de novo*, soit en utilisant un gabarit (template) déjà créé antérieurement. Un nouveau gabarit est habituellement créé pour une nouvelle méthode, lors de son développement. En routine, on débute généralement une analyse en utilisant un gabarit déjà programmé. Ces gabarits sont enregistrés sur le disque de l'ordinateur de traitement. La liste LI-BM-008 fait la description de tous les templates déjà enregistrés sur les instruments Quantstudio 3.

A. Programmation d'une plaque

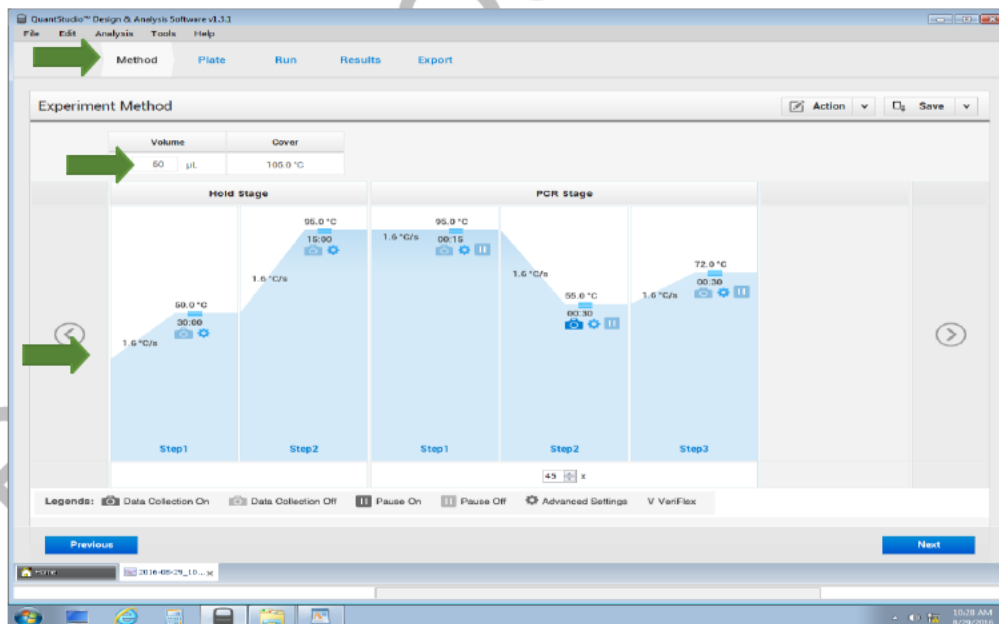
- Il est possible d'ouvrir une plaque déjà préparée en appuyant sur «Open». Sélectionner la plaque .edt pour une plaque préparée et encore non-utilisée ou sur une plaque .eds pour visualiser une plaque incluant des données.
- Dans l'encadré 'New Experiment' de l'écran de départ ('Home screen'), cliquer sur la flèche « v » à droite du choix 'Create New Experiment' suivi de 'Template'. Voir l'illustration à la page suivante.



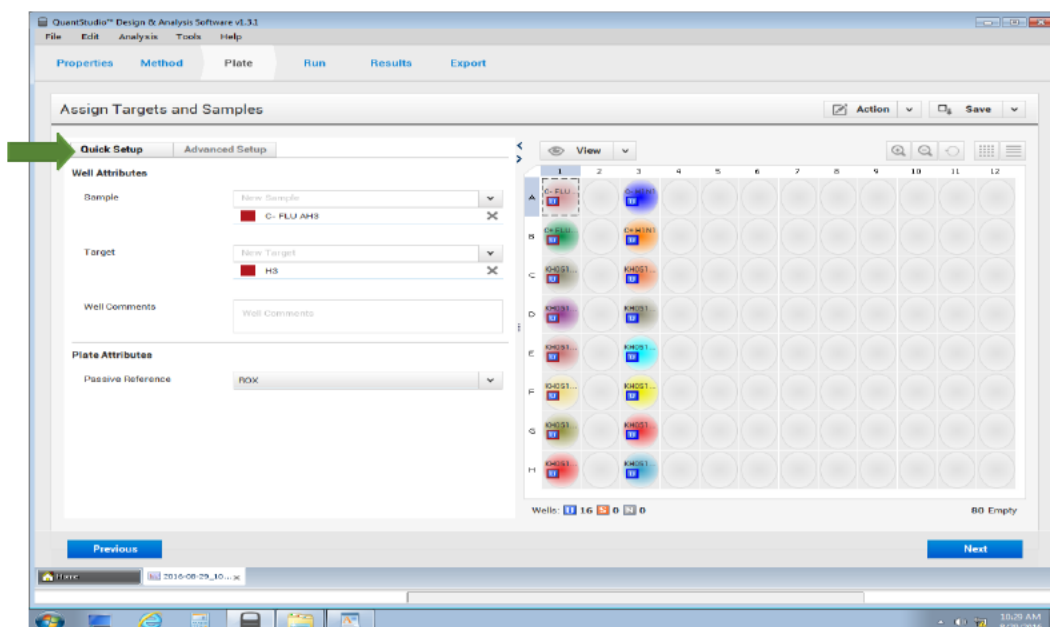
- Sélectionner le gabarit (template) approprié dans le répertoire 96 Well/ Biomol et cliquer 'Open'. Pour les analyses du secteur BM, voir la liste LI-BM-008 au besoin.
- Vérifier/modifier les données préinscrites dans les onglets suivants :
 1. **«Properties»** : modifier le nom de l'analyse et, au besoin les autres paramètres.
 2. Pour les analyses du secteur BM : ajouter au début un code décrivant le type d'analyse (Ex : pour le virus de l'influenza, ajouter FLU, pour créer **FLU2016-08-29_101206**).
 3. Pour les analyses du secteur IDBM : saisir le nom de l'analyse dans le format « AAAAMMJJ-XX_Analyse ». L'indication XX correspond aux initiales du technicien et « Analyse » correspond à l'abréviation utilisée pour l'analyse à effectuer (ex. carba, STEC, Mchim), tel qu'indiqué dans la procédure associée à cette analyse.



4. «**Method**» : vérifier que les paramètres inscrits correspondent à ceux de la méthode décrite dans le document LI-BM-008 (BM) ou sur le registre de la procédure à effectuer (IDBM), et que le volume du mélange réactionnel corresponde à celui du protocole.



5. «**Plate**» : en utilisant les fonctions habituelles de Windows ('shift', 'ctrl', sélection de colonnes ou de lignes en cliquant sur les entêtes), on peut assigner des puits aux noms d'échantillons et aux cibles recherchées, puis y inscrire les fluorophores et quencher utilisés. Vérifier qu'à l'onglet «Quick Setup»/«Plate Attributes» que le «Passive reference» soit correctement assigné selon que l'analyse se fait avec ou sans ROX.



Toutefois, il est plus rapide d'utiliser un fichier Excel préprogrammé à cet effet, qui sera alors utilisé pour importer les données requises à cette étape. Les instructions sont les suivantes :

Ouvrir le fichier QS3template.xlsm, notamment disponible sur S/Partage/ Biologie moléculaire/ Quantstudio/ QS3template.xlsm. Cliquer sur la touche «Activer le contenu» afin d'activer les fonctions macros.

- i. Au 1^{er} onglet «Échantillons», inscrire les numéros des échantillons à analyser selon l'emplacement final désiré sur la plaque 96 puits à l'aide de la colonne «Position».

Déterminer quelle cible «Target» est à analyser pour chacun des échantillons.

Note : Le nom des cibles ainsi que le «reporter» et le «quencher» associé au fluorophore de la sonde sont décrits dans le 4^e onglet «Clef».

- ii. Lorsque la liste est complétée, il est possible d'imprimer le schéma de plaque 96 puits en cliquant sur l'onglet «Plaque 96».
- iii. Finalement, aller sur l'onglet «QS3». Toutes les informations inscrites seront automatiquement transférées sur cette page.

Note : Il est possible d'enregistrer les informations inscrites en fichier Excel afin de pouvoir retourner les utiliser à un autre moment.

Pour transférer les informations vers l'appareil QS3 :

- Insérer une clé USB au module informatique.
- Faire, enregistrer sous;
Nom du fichier : FLU20160829.txt
Type du fichier : Texte (séparateur : tabulation)(*.txt)
Enregistrer
- Boîte Microsoft Excel, appuyer sur OK, boîte Microsoft Excel, appuyer sur OUI.
- Fermer Excel et répondre NON à la question : Voulez-vous enregistrer les modifications apportées à «FLU20160829.txt»?
- Retirer la clé du module informatique.

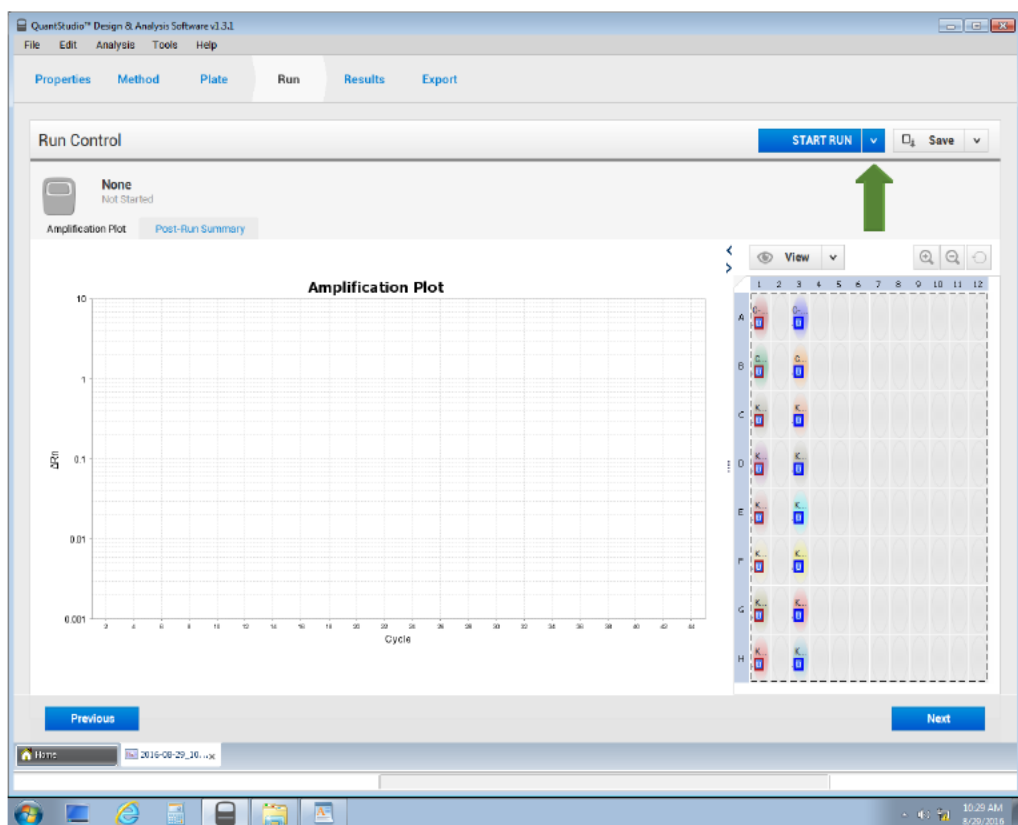
Pour importer la plaque préenregistrée dans le QS3 :

- Introduire la clé USB avec le fichier texte enregistré préalablement à l'ordinateur associé au QS3.
- Appuyer sur File / Import Plate Setup.
- Appuyer sur «Browse» et aller sélectionner le fichier désiré.
- Appuyer sur OK. Un message mentionnant que le transfert a été effectué avec succès apparaît à l'écran.
- Les informations sont maintenant disponibles.

IMPORTANT : PCR multiplexe

Le fichier template Excel ne permet pas d'ajouter plus d'une cible/puits. Après l'importation de la plaque, cliquer sur l'onglet «Advanced Setup». Avec la souris, sélectionner les échantillons sur la plaque 96 puits et choisir les cibles supplémentaires dans la section «Targets». Chacune des cibles se retrouvera visible par un carré dans chacun des puits de la plaque 96 avec sa couleur associée.

6. «**Run**» : ouvrir le tiroir et insérer la plaque sur le bloc d'amplification. Refermer le tiroir. Appuyer sur la flèche « v » à droite du 'Start Run'. Le logiciel cherchera le numéro de l'appareil associé à l'ordinateur (numéro inscrit sur l'écran (au centre, en haut) de l'appareil. Sélectionner l'appareil et la série d'analyse débutera automatiquement. La durée de l'analyse et le temps restant est inscrit sur l'écran du QuantStudio.



7. «**Results**» : le logiciel nous présente les résultats dans cet onglet sitôt l'analyse complétée. Si aucun résultat n'apparaît, cliquer sur le bouton 'Analyse'. Par défaut, les résultats sont présentés sous forme de graphique dont l'abscisse montre les cycles d'amplification et l'ordonnée, la valeur de Rn en Log₁₀. Le Rn représente la différence entre la fluorescence détectée à chaque cycle par rapport à la valeur seuil ('baseline') détectée au début de la réaction.

Cliquer sur l'icône représentant un œil (pointé par la flèche rouge), un encadré s'ouvre dans lequel peuvent être ajustés les paramètres de présentation du graphique (voir image suivante). De façon générale, les choix suivants sont à privilégier :

Plot Type : ΔR_n vs Cycle

Graph Type : Linear

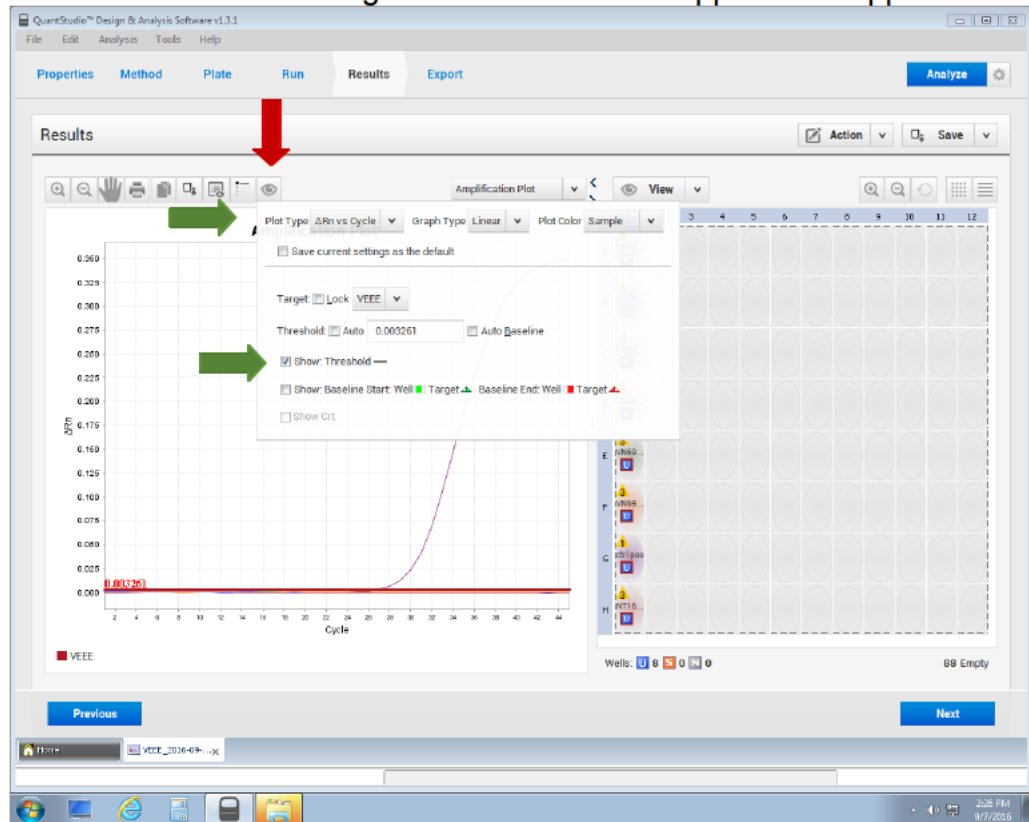
Plot Color: Sample (permet de voir les courbes avec la couleur associé à chaque échantillon) ou Target (permet de voir les courbes avec la couleur associées à chaque cible)

Décocher les items Threshold Auto et Auto Baseline.

L'item «Show: Threshold» doit être actif.

Le threshold peut ensuite être ajusté manuellement au besoin.

Important : Il faut ajuster le threshold pour chacune des cibles effectuées. Celui-ci sera gardé en mémoire et rapporté au rapport final.



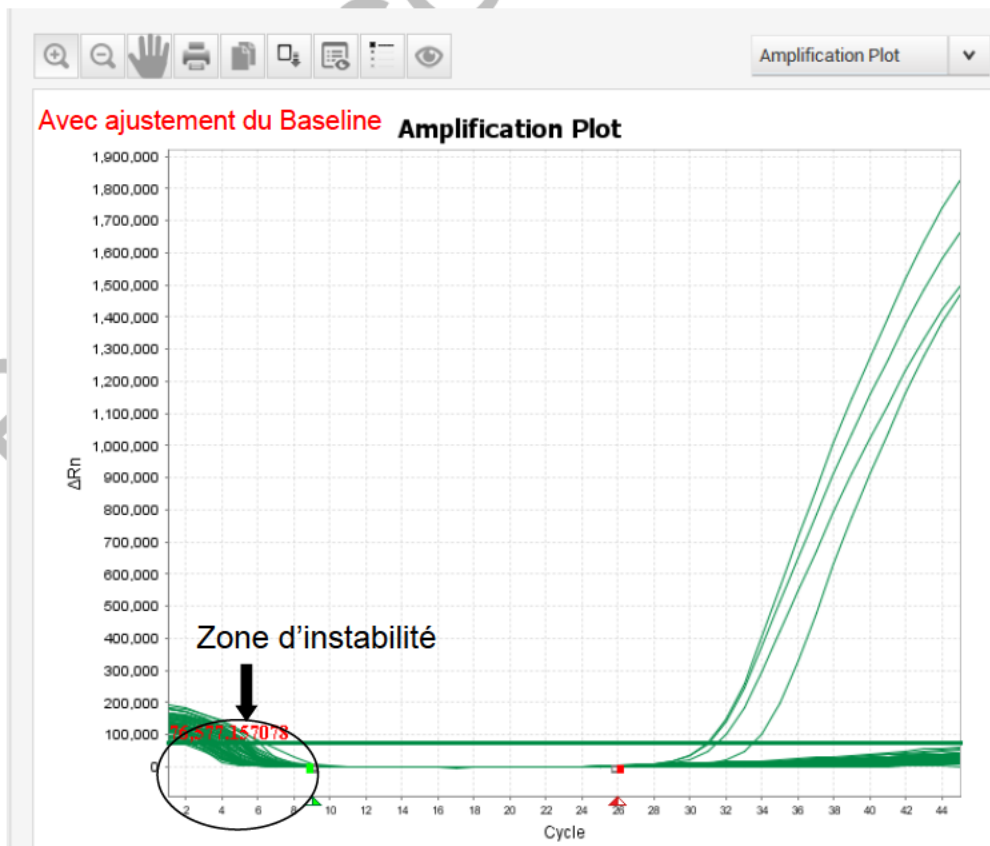
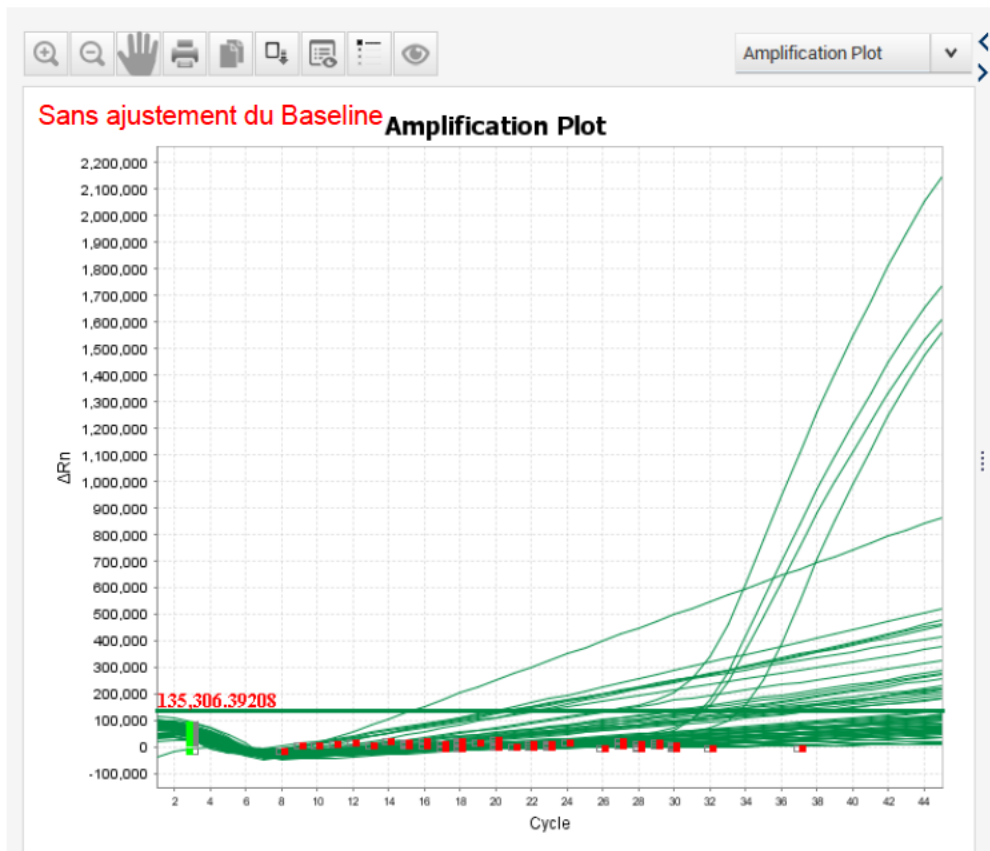
Pour ne voir qu'une seule cible à la fois, simplement la sélectionner via l'option «Target» de ce même tableau.

Il peut aussi être nécessaire d'ajuster le Baseline, surtout si il y a beaucoup de bruit de fond dans les premiers cycles d'amplification.

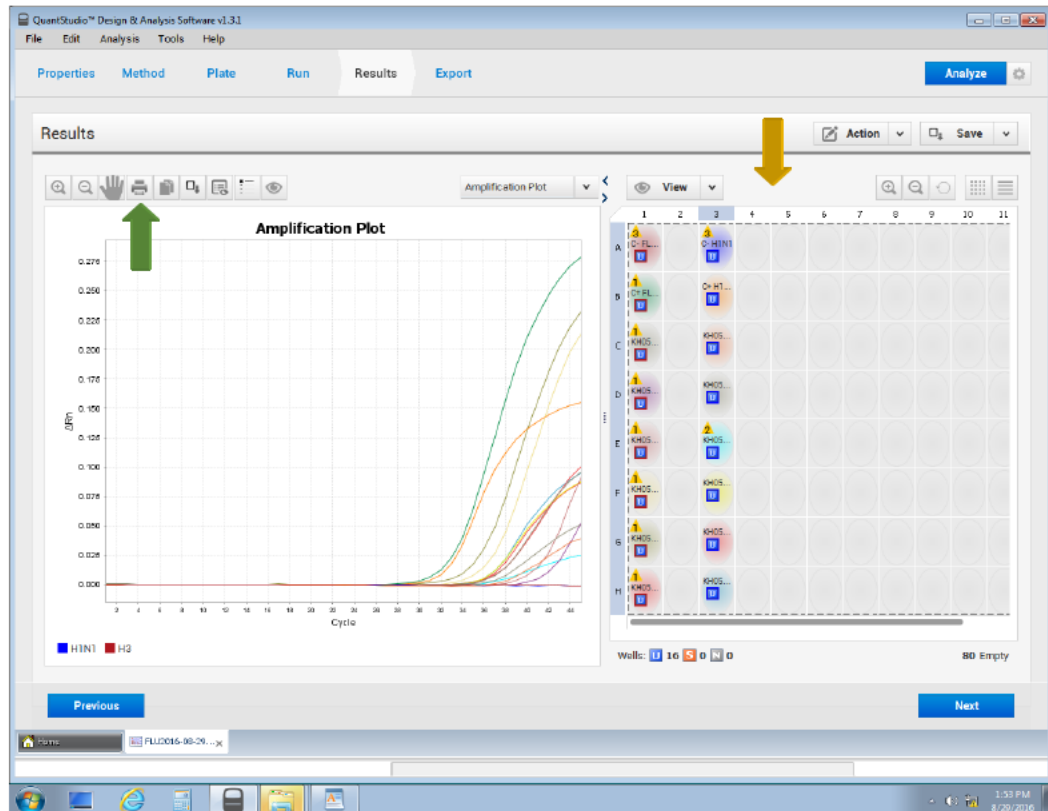
Pour se faire :

- cocher « Show Baseline » ;
- déplacer le triangle vert pour fixer le début du « Baseline » après la zone d'instabilité de la fluorescence, si il y a lieu ;
- déplacer le triangle rouge pour fixer la fin du « Baseline » environ 2 Ct avant la courbe de la série d'analyse ayant la Ct la plus faible pour cette cible.
- Appuyer sur «Analyse» dans le coin supérieur droit pour la réanalyse des courbes de la série d'analyse.

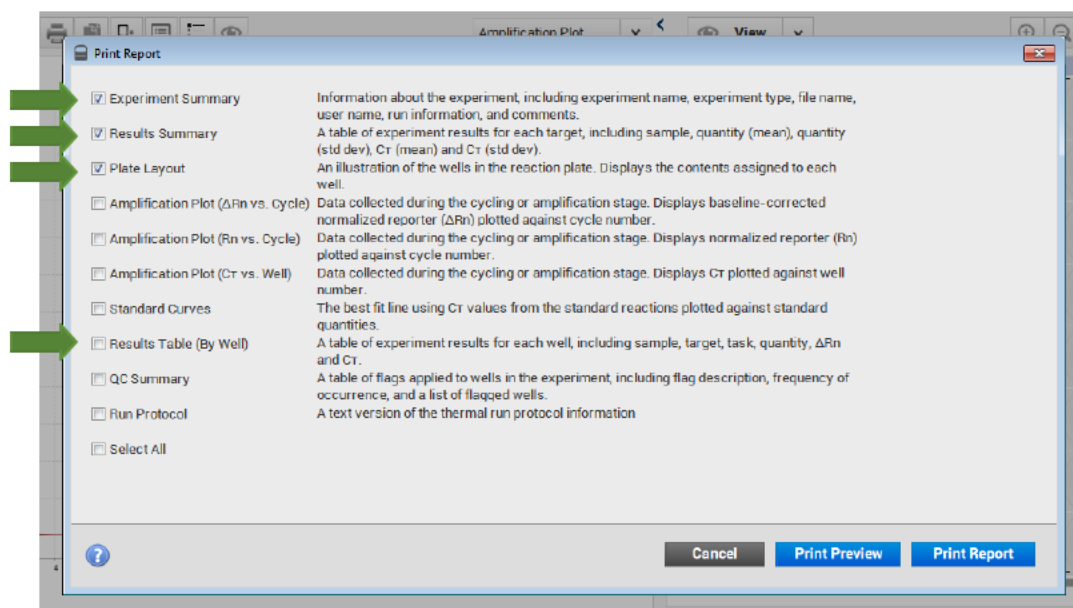
Il est possible d'ajuster le « Baseline » seulement une cible à la fois.



8. Impression du graphique et des résultats



- Appuyer sur le logo de l'imprimante afin de pouvoir imprimer le graphique. Il est possible d'imprimer seulement une partie des échantillons en faisant une sélection des échantillons désirés en utilisant le schéma de la plaque 96 puits à droite de l'image ci-haut (flèche orange).
- Générer un rapport de la série en appuyant sur File/Print Report. Faire la sélection des 4 items suivants (ou en sélectionner d'autres, selon les besoins de l'analyse):



Appuyer ensuite sur Print Report.

Informations importantes à savoir :

- Dans la section «Results summary» :

Si vous avez plus d'un puits avec le même numéro pour la même cible, la valeur Ct visible sera la moyenne de toutes ses valeurs.

Pour avoir la valeur du puits particuliers, consulter la section «Results Table».

- Dans la section «Plate Layout» :

Lorsqu'une PCR est effectuée en monoplexe, il est possible de voir les valeurs Ct ainsi que l'identification des échantillons sur ce tableau en format plaque 96-puits.

9. Sauvegarde des résultats en BM

Une fois toutes les modifications effectuées, sauvegarder la série d'analyse à l'endroit suivant :

Partage / LSPQ_PCR en temps réel / QS3 / agent étiologique /

agent étiologique : Chlamydia, Influenza, MERS, Norovirus et VNO. Au besoin de nouveaux dossiers peuvent être créés pour conserver les données d'analyses.

10. Utilisation de l'interface pour le secteur BM

- a) Créer une série d'analyse dans le SGIL incluant les contrôles de qualité (devant être nommés de la bonne façon que dans le SGIL) si nécessaire.
- b) Après la sauvegarde de la série, appuyer sur l'onglet «Export» du logiciel du QuantStudio.
- c) Vérifier que le préfixe du «file name» associé à la série correspondre à la LI-BM-008 de la colonne «code d'analyse».
- d) Dans «file type», sélectionner le type de fichier «.txt».
- e) Dans «location», appuyer sur «Browse» et faire le chemin suivant : STARLIMS_GRABBER / Biologie moléculaire / QuantStudio / préfixe (code d'analyse : CAL, CHLAM, FLU, MERSCoV, NORO, VEEE, VNO, ou autres) / CHLAM_20170804_133305.txt et appuyer sur «Open».
- f) Décocher le «Open exported files when complete».
- g) Appuyer sur «Export» situé en haut à droite de la page.
- h) Le transfert des données peut prendre plusieurs minutes avant d'être disponible au SGIL.

XIII. RÉFÉRENCES

QuantStudio™ Design and Analysis Software – User Guide

XIV. DOCUMENTS ASSOCIÉS

LI-BM-008 Méthodes d'amplification préprogrammées pour la PCR avec détection en temps réel

Méthodes d'amplification préprogrammées pour la PCR avec détection en temps réel

Procédures ISO	Code d'analyse (onglet « Propriétés ») et/ou code d'exportation vers SGIL	Gabarit « Template »	Passive reference (pour QS3/QS5)	Reporter		Quencher	Programmation	Temps approximatif	Volume
PR-BM-122 Chlamydia LGV/non-LGV	CHLAM (Attention : Run mode : FAST)	ChlamydiaLGV	None	pmpH-LGV	VIC	NFQ-MGB	95 °C 2 min 95 °C 5 s 60 °C 30 s 45 cycles	0 h 50	25 µl
				pmpH- non-LGV	FAM	None			
				Cryptique	Texas Red	None			
				RNaseP	ABY	None			
PR-BM-069 (Influenza) (FluA, FluB, H1, H3, H5, H7N9 et H1N1pdm09 gène HA)	FLUAB (Typage A/B) FLUH1H3 (sous-typage H1/H3) FLUH5H7 (sous-typage H5/H7)	H5HACDC	ROX	Flu A	FAM	NFQ-MGB	50 °C 30 min 95 °C 15 min 95 °C 15 s 55 °C 30 s 72 °C 30 s 45 cycles	2 h 30	25 µL
				Flu B	FAM	NFQ-MGB			
				H1	FAM	TAMRA			
				H3	FAM	TAMRA			
				H5	FAM	NFQ-MGB			
				H7N9	FAM	NFQ-MGB			
				H1N1 pdm09	FAM	NFQ-MGB			
PR-BM-069 (Influenza) H7sas, H7CDC	FLU	CDC_INFH7	ROX	FAM		TAMRA	50 °C 30 min 95 °C 15 min 95 °C 15 s 60 °C 30 s 45 cycles	2 h 00	25 µL
PR-BM-130 (PCR Multiplexe- entériques)	GE_ (Attention : Run mode : FAST)	MultiplexGI	None	Norovirus GII	FAM	NFQ-MGB	53 °C 10 min 95 °C 2 min 95 °C 3 s 60 °C 30 s 45 cycles	1 h 05	20 µL
				Norovirus GI	ABY	NFQ-MGB			
				Astrovirus	JUN	None			
				Sapovirus	FAM	NFQ-MGB			
				Rotavirus	JUN	None			
				gAdenovirus (F40/41)	FAM	None			
				MS2	ABY	None			
				Adenovirus	JUN	None			

Voir la suite →

Procédures ISO	Code d'analyse (onglet « Properties ») et/ou code d'exportation	Gabarit «Template» ou nom de méthode	Passive reference (pour QS3)	Reporter		Quencher	Programmation	Temps approximatif	Volume
PR-BM-126 N. gonorrhoeae	GONO (Attention : Run mode : FAST)	Gono	None	opa	YakYel	None	95 °C 2 min 95 °C 5 s 60 °C 30 s 45 cycles	0 h 50	25 µL
				porA	FAM	None			
				RNaseP	ABY	None			
PR-BM-079 (Mers-CoV) UpE	MERSCOV	Corona	ROX	FAM		TAMRA	50 °C 30 min 95 °C 15 min 94 °C 15 s 58 °C 30 s 40 °C 30 s 45 cycles	2 h 00	25 µL
QS5 Seulement PR-BM-132 Multiplex respiratoire	Multiplex respi	Multiplex respi	ROX	FLUA TR	Texas Red	None	53 °C 10 min 95 °C 2 min 93 °C 3 s 60 °C 30 s 45 cycles	0 h 52	25 µL
FLUBatto550tao				Atto550tao					
E_Corman				FAM					
RSV atto647tao				Atto647tao					
PR-BM-129 (P. jirovecii, trousse Altona)	PNEUMO	Pneumo	ROX	P. jirovecii	FAM	None	95 °C 2 min 95 °C 15 s 58 °C 45 s 72 °C 15 s 45 cycles	2 h 30	30 µL
			IC	VIC	None				
PR-MY-111 Pneumocystis MLST	Pneumo_MLST	Pneumocystis	ROX	SYBR		None	95 °C 15 min 94 °C 30 s 60 °C 45 s 72 °C 30 s 65 °C 30 s 95 °C 30 s 55 cycles 00 :10	2 h 30	25 µL

Voir la suite →

Procédures ISO	Code d'analyse (onglet « Properties ») et/ou code d'exportation	Gabarit «Template» ou nom de méthode	Passive reference (pour QS3)	Reporter		Quencher	Programmation	Temps approximatif	Volume
PR-BM-131 Région N et/ou E Del 69-70, FAM-N501, JUN-Y501	SARS-Cov-2 (NCOV_ CCOV_ , VMUT_) (Attention : Run mode : FAST)	SARS-CoV-2	None	E_Corman	FAM	NFQ-MGB	53 °C 10 min 95 °C 2 min 93 °C 3 s 60 °C 30 s 45 cycles	0 h 52	20 µL
				CoVN_LSPQ	FAM				
				Swt3aby	ABY	None			
				FAM-N501	FAM				
				JUN-Y501	JUN				
PR-BM-066 (VNO humain)	VNO	VNO-Humain	ROX	ProC	FAM	NFQ-MGB	20 °C 5 min 50 °C 30 min 95 °C 15 min 94 °C 15 s 60 °C 1 min 45 cycles	2 h 30	25 µL
				ENV	FAM	TAMRA			
PR-BM-039 (VNO entomologique) Région 3NCR	VNO	VNO-3NC	ROX	FAM		TAMRA	20 °C 5 min 50 °C 30 min 95 °C 15 min 94 °C 15 s 61,7 °C 1 min 45 cycles	2 h 30	50 µL
PR-BM-039 (VNO entomologique) Région ENV	ENV	VNO-ENV	ROX	FAM		TAMRA	20 °C 5 min 50 °C 30 min 95 °C 15 min 94 °C 15 s 60 °C 1 min 45 cycles	2 h 30	50 µL

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Fait par : _____

Date : _____

Lot de la trousse TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX : _____

Date de péremption : _____

Préparation du mélange réactionnel : _____ Nb échantillons (n+1) : _____

Réactifs	N° lot ou date de fabrication	Date de péremption	Volume (µl) par réaction	Volume total (µl) dans le mélange réactionnel
4X TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX			5,0	
Mix amorces/sondes	C:		10,0	
	E:			
	Ewt3:			
	501:			

Volume du mélange réactionnel : 15,0

Volume de la préparation d'acides nucléiques : 5,0


Micropipettes utilisées	
Réactifs	Pré-PCR

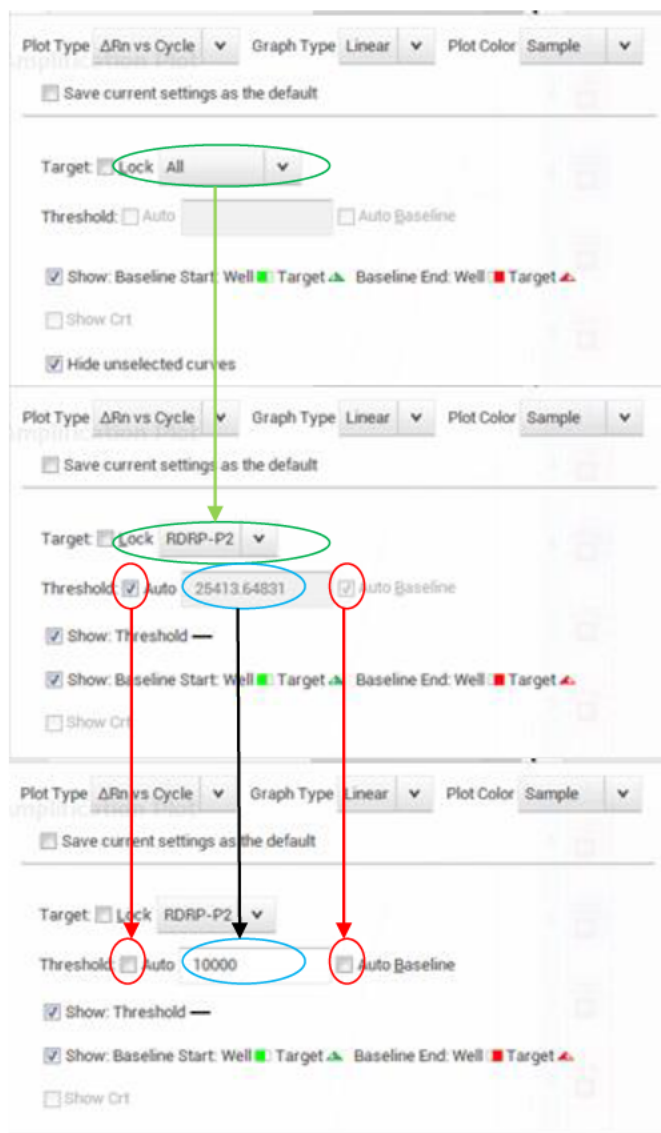
Instrument utilisé :

- QS #1 (#8902)
- QS #2 (#9130)
- QS #3 (#9304)

Mix	Cible	Rapporteur	Répresseur	Note	Programme
E	E (Corman)	FAM	NFQ-MGB	Désélectionner la normalisation ROX	Run mode : FAST SARS-CoV-2
C	N (LSPQ)	FAM	NFQ-MGB		53° C 10 min
Ewt3	E (Corman) del69-70	FAM ABY	NFQ-MGB None		95° C 2 min
501	N501 N501Y	FAM JUN	None None		95° C 3 s
					60° C 30 s 45 X

Ajustement des valeurs seuil

- 1) Sélectionner tous les échantillons testés par le premier mix et cliquer sur l'onglet « Show Plot Settings » .
- 2) Sélectionner la cible choisie dans le menu déroulant de la section "Target" (flèche en brun sur la figure) et décocher les fenêtres "Threshold" et "Autobaseline" (flèches en vert sur la figure).
- 3) Incrire dans la fenêtre "Threshold" (flèche en bleu dans la figure) la valeur seuil correspondante à la cible choisie, telle qu'indiqué dans le tableau ci-joint.
- 4) Refaire le même exercice avec chacune des autres cibles si nécessaire.



Mix	Cible	Valeur seuil
E	E (Corman)	10 000
C	N (LSPQ)	10 000
Ewt3	E (Corman)	10000
	del69-70	10000
501	N501-FAM	10000
	N501Y-JUN	20000



Préparation des mélanges d'amorces et sondes – Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel

Fait par : _____

Date : _____

Qualification par : _____

Date : _____

MIX	Amorces/sondes (TOUTES à 100 µM)	No Lot – Date de préparation	µl
E	E_Sarbeco_F1		8,0
	E_Sarbeco_R2		8,0
	E_Sarbeco_P1		4,0
	Eau DEPC :		980,0
C	WuhanCoV_Nf		8,0
	WuhanCoV_Nr		8,0
	CoVnp		4,0
	Eau DEPC :		980,0

Ewt3	E_Sarbeco_F1		8,0
	E_Sarbeco_R2		8,0
	E_Sarbeco_P1		4,0
	Sforw:		8,0
	Srev		8,0
	Sw3ABY		4,0
	Eau DEPC		960,0
501	501f		8,0
	501r		8,0
	FAM-N501		4,0
	JUN-Y501		4,0
	Eau DEPC :		976,0

Date de péremption de l'eau DEPC : _____

Micropipettes utilisées				