

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval 	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

Table des matières

But	Principe	Réception	Réactifs, matériel et appareil requis
Procédure	Interprétation des résultats	Rapport	Références

But

Cette procédure opérationnelle normalisée a pour objectif de démontrer les étapes et les limites de la technique de dépistage du SARS-CoV-2 par RT-PCR pour les patients de priorité #1-2 dont le spécimen est nasopharyngé.

Principe

Le test Simplexa™ COVID-19 Direct consiste en un système d'amplification par RT-PCR en temps réel qui permet l'amplification directe, la détection et la différenciation de l'acide nucléique du virus SARS-CoV-2 dans des prélèvements nasopharyngés n'ayant pas subi de procédure d'extraction de l'acide nucléique. Des sondes-amorces fluorescentes bifonctionnelles sont utilisées conjointement avec des amorces inverses correspondantes pour amplifier l'ARN du SARS-CoV-2 et du contrôle interne.

Étapes

Préparation de l'échantillon (par le technologiste)

- ◆ Ajout d'un mélange réactionnel, incluant des sondes et un contrôle interne
- ◆ Amplification et détection en temps réel sur l'appareil Integrated Cyclor 3M™
 - Le contrôle interne permet de s'assurer que le processus d'amplification a bel et bien eu lieu pour chacun des échantillons (absence d'inhibiteurs et mélange réactionnel intègre)

Réception

- **Milieu de transport**
 - ◆ Les écouvillons velouteux nasopharyngés dans le milieu de transport UTM/ UVT ou la saline 0.9% transportés sur glace sont acceptés.
 - ◆ Conserver les échantillons entre 2-8°C dès réception jusqu'au moment de l'analyse.
 - ◆ Rejeter tous autres types de spécimen .Voir Section « [Rapport](#) ».
 - ◆ L'écouvillon velouteux doit être présent dans le milieu UTM/UVT/saline 0.9%. Si l'écouvillon velouteux est absent, rejeter le spécimen. Voir section « [Rapport](#) ».
 - ◆ Pour les spécimens autres que nasopharyngé, procéder à l'analyse sur le BDMAX ([MIC-PON-291](#))
- **Disponibilité**
 - ◆ 7 jours sur 7 entre 6h et 00h.
- **Provenance des échantillons:**
 - ◆ Faire en PCR les échantillons ayant le code «COVIR»
 - ◆ Seuls les échantillons de priorité 1 et 2 seront analysés par cette technique, se référer à la procédure «[MIC-PON-281 : Dépistage de coronavirus et autres MRSI](#)»
- **Si le nombre d'échantillon est trop élevé pour pouvoir faire toutes les analyses au laboratoire dans la même journée :**
 - ◆ Consulter l'assistante-chef ou la coordonnatrice technique.
 - ◆ Procéder à l'envoi à Ste-Justine
 1. Aller dans la requête
 2. Annuler le test COVIR

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval 	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

3. Ajouter le test COVSJ
4. Sauvegarder la requête
5. Procéder à l'envoi tel que décrit dans la procédure [«MIC-PON-281 : Dépistage de coronavirus et autres MRSI»](#)

- **Les échantillons peuvent être conservés**

- ◆ 24 heures à 2-8°C
- ◆ 7 jours à -20°C
- ◆ Indéfiniment à -80°C

Réactifs, matériel et appareil requis

- **Réactifs et matériel**

- ◆ Procédures automatisées (par le système «Integrated Cycler 3M™») incluant :
 - Trousse Simplexa™ Direct COVID-19 (Mélange réactionnel). Conserver entre -80°C dès réception dans un congélateur sans dégivrage automatique.
 - * La trousse doit être amenée à la température de la pièce avant la procédure et être utilisée dans les 30 minutes suivant la sortie du congélateur.
 - * Ne pas utiliser au-delà de la date d'expiration.
 - * Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents sur le même cycle.
 - * Ne pas endommager les codes à barres sur les réactifs.
 - * Ne pas vortexer le réactif ni le secouer.
 - * Ne pas recongeler le réactif.
 - Disques d'amplification (8 places) conservés à la température de la pièce.
 - Pipette à volume fixe 50µl
 - Embout pour pipette (stérile, avec filtre et sans nucléase)
 - Simplexa COVID-19 Positive Control pack. Conserver entre -80°C dès réception dans un congélateur sans dégivrage automatique.
 - Ultracentrifugeuse pour les réactifs

- **Appareil**

- ◆ **Capacité maximale de l'appareil** = 8 tests par technique de PCR
 - 1^{ère} technique du jour : jusqu' à 6 échantillons + 1 contrôle POSITIF (Simplexa COVID-19 Positive Control pack) + 1 contrôle NÉGATIF (milieu UTM stérile)
 - 2^e et + technique du jour : jusqu' à 8 échantillons
 - * Refaire les contrôles positif et négatif au courant d'une même journée lors d'un changement de lot.
- ◆ Quantité de réactifs à prévoir à chaque technique de PCR
 - Pour chaque échantillon et chaque contrôle de qualité :
 - * 1 tube de mélange réactionnel
 - * 1 place dans le disque d'amplification

Procédure

- **Préparer les réactifs nécessaires :**

- ◆ Prendre le nombre de mélanges réactionnels requis selon le nombre d'échantillons/contrôles à tester et les décongeler à la température de la pièce dans un portoir. (la technique doit être effectuée dans les 30 minutes suivant la décongélation du mélange réactionnel)
- ◆ Centrifuger (centrifugation rapide, environ 10 secondes) les tubes de mélange réactionnel pour s'assurer qu'il ne reste aucun liquide sur le rebord ou dans le couvercle du tube.
- ◆ S'assurer d'avoir le nombre suffisant de places dans le disque d'amplification selon le nombre d'échantillons à tester.

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval 	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

- **Préparation des échantillons :**
 - ◆ Vérifier que l'appareil est en fonction avant la manipulation des échantillons.
 - Voir le protocole « Integrated Cyclers 3M™ » pour procéder à l'analyse.
 - ◆ L'échantillon est prêt à être testé sans préparation.
 - ◆ Numérotter les spécimens selon les puits utilisés pour l'analyse.
 - ◆ Faire la liste de travail
 - Voir le protocole « [Integrated Cyclers 3M™](#) »
- **Chargement du disque d'amplification :**
 - ◆ Préparer le disque d'amplification **sous l'enceinte biologique**.
 - ◆ Répéter les étapes 1 à 5 pour chaque échantillon
 - 1. Vérifier que le mélange réactionnel est bien décongelé
 - * Ne pas vortexer le mélange réactionnel ni l'inverser. S'assurer qu'il n'y a pas de goutte le long des parois ou dans le couvercle sinon la quantité de réactif sera inférieure aux 50 uL nécessaires.
 - 2. Un secteur à la fois, détacher **partiellement** le film adhésif pour exposer le puit de l'échantillon « SAMPLE » et le puit de réaction « R »
 - * Ne pas retirer entièrement le film adhésif
 - * Éviter de toucher l'envers du film adhésif qui entrera en contact avec les puits et la surface du disque
 - 3. Transférer 50µl de mélange réactionnel dans le puit de réaction « R »
 - Changer d'embout
 - 4. Transférer 50µl d'échantillon ou de contrôle dans le puit « SAMPLE »
 - 5. Recouvrir le secteur pour sceller les puits avec le film adhésif détaché auparavant et détacher les pointillés
 - * Si le film adhésif original est déchiré, le remplacer avec un film adhésif de remplacement
 - 6. **Mettre le disque dans un sac Ziploc pour le transporter vers l'appareil.**
 - 7. Charger le disque d'amplification dans l'appareil « [Integrated Cyclers 3M™](#) », vérifier que le couvercle magnétique est bien en place et démarrer la série.
 - Voir le protocole « [Integrated Cyclers 3M™](#) » pour procéder à l'analyse.
 - ◆ Remettre l'échantillon au réfrigérateur pendant le cycle d'analyse.
 - ◆ À la fin du cycle, vérifier la couleur de la fenêtre de chaque échantillon sur le disque.
 - Une teinte rosée indique que l'échantillon et le réactif ont bien été délivrés dans le bon puit.
 - Une teinte brune indique une inversion du réactif et de l'échantillon et une analyse invalide.

Contrôles de qualité

- **Chaque puit du disque d'amplification « Integrated Cyclers 3M™ » contient un contrôle de traitement des échantillons qui permet de mettre en évidence la présence d'inhibiteur ou une panne lors du traitement de l'échantillon dû à l'appareil ou au réactif. L'échantillon sera résulté comme « invalide » lors de l'échec de ce contrôle.**
- **Les contrôles de qualité externes:**
 - Positif : Simplexa COVID-19 Positive Control pack prêt à usage
 - Négatif : utiliser un milieu de transport non inoculé (chaque type de milieu de transport (saline ou UTM) reçu dans la journée doit être testé comme CQ négatif une fois)
 - ◆ Effectuer une fois par jour, la première technique de la journée ou en tout temps lors d'un changement de lot. Effectuer la même procédure que les échantillons.

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval 	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

Interprétation des résultats

L'interprétation se fait dans l'ordinateur selon les critères suivants :

Résultats attendus pour contrôle de qualité			
Contrôle de qualité	Cible ORF1ab	Cible gène S	CQ interne
CQ positif	Positif	Positif	Non applicable
CQ négatif NTC	Négatif	Négatif	Valid

Résultats		Interprétation des résultats
Cible pour le SARS-CoV-2		
ORF1ab	Gène S	
Positif	Positif	Présence de l'ARN du SARS-CoV-2
Positif	----	Présence de l'ARN du SARS-CoV-2
----	Positif	Présence de l'ARN du SARS-CoV-2
Négatif	Négatif	ABSENCE de l'ARN du SARS-CoV-2
Invalide		Résultat non concluant dû à l'échec du CQ interne ou à un volume d'échantillon insuffisant. L'échantillon doit être retesté.

- **Résultat Invalide / EC500, EC505, EC515**
 - ◆ Reprendre l'analyse à partir de l'échantillon lors de la prochaine technique.
 - ◆ Si l'échantillon est très muqueux reprendre le spécimen en le diluant 1:10.
- **Un contrôle positif invalidé annule toute la série**
 - ◆ Aviser un microbiologiste.
 - ◆ Reprendre toute la série à partir de l'échantillon.
 - ◆ Inscrire les actions entreprises sur le registre de contrôle de qualité
- **Un contrôle négatif invalidé annule toute la série et indique une contamination par le virus SARS-CoV-2 (échantillons ou amplicons)**
 - ◆ Aviser un microbiologiste.
 - ◆ Reprendre toute la série à partir de l'échantillon.
 - ◆ Inscrire les actions entreprises sur le registre de contrôle de qualité

Rapport

- **Les résultats sont émis dans Softlab, poste de travail SER09**
- **Pour les PCR négatifs :**
 1. Inscrire «NON DÉTECTÉ»
 2. Ajouter les messages prédéfinis :
 - «Résultat obtenu par une technique de détection d'acides nucléiques non validée selon la procédure habituelle. Veuillez interpréter les résultats avec circonspection.»
 - «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. »
 3. Inscrire le message prédéfini correspondant à la trousse utilisée :

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval 	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

- «Analyse effectuées avec la trousse Simplexa™ Covid-19, Diasorin. La limite de la détection est de 500 copies/ ml»
- 4. Ajouter les copies à GRIP et PDI
- 5. Valider en final et les renseignements cliniques
- **Pour les PCR positifs :**
 1. Inscrire « DÉTECTÉ »
 2. Ajouter le message prédéfini :
 - «Résultat obtenu par une technique de détection d'acides nucléiques non validée selon la procédure habituelle. Veuillez interpréter les résultats avec circonspection.»
 3. Inscrire le message prédéfini correspondant à la trousse utilisée :
 - «Analyse effectuées avec la trousse Simplexa™ Covid-19, Diasorin. La limite de la détection est de 500 copies/ ml»
 4. Ajouter le message MADO
 5. Ajouter les copies à GRIP, PDI et DSP
 6. Valider en final et les renseignements cliniques
 7. **Congeler un aliquots pour les spécimens positifs à -80 °C**
- **Pour les spécimens dont le résultat était «équivoque» sur le BDMAX**
 - ◆ Inscrire « ? Équivoque sur BDMAX »
 - ◆ Si le résultat est **positif**
→ suivre la procédure ci-haut
 - ◆ Si le résultat est **négatif**
→ suivre la procédure ci-haut
 - ◆ Si le résultat est **invalide** :
 1. Inscrire «ÉQUIVOQUE»
 2. Inscrire le message prédéfini correspondant à la trousse utilisée :
 - «Analyse effectuée avec la trousse RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO sur l'appareil BDMAX. La limite de la détection est de 200 copies/ ml»
 3. Ajouter le message prédéfini :
 - «Il est suggéré de soumettre un nouvel échantillon si cliniquement indiqué.»
 - «Spécimen envoyé au laboratoire de référence pour confirmation»
 4. Ajouter les copies à GRIP, PDI et DSP
 5. Valider en final et les renseignements cliniques
 6. Ajouter le test de confirmation «CLSPQ» à la requête et envoyer au LSPQ
- **Pour les PCR Invalide / EC500, EC505, EC515:**
 - ◆ Si 2° PCR est négatif ou positif, se référer à la procédure telle qu'indiquée ci haut
 - ◆ Si 2° PCR est invalide ou avec EC500 :
 1. Inscrire « INVALIDE »
 2. Ajouter le message prédéfini :
 - «Présence d'interférence lors de l'analyse: résultat non interprétable. Analyse à reprendre»
- **Lors de problème de contamination**
 - ◆ Faire la procédure de non-conformité
- **Si prélèvement inadéquat**
 - ◆ Faire la procédure de non-conformité

Centre intégré de santé et de services sociaux de Laval  Québec	Biologie médicale CISSS de Lanaudière Nord - CHDL	
	Secteur d'activité : Laboratoire Microbiologie	
DÉPISTAGE COVID-19 PAR PCR TROUSSE SIMPLEXA™		
N° Procédure: MIC-PON-290	Version : 001	Statut : actif

Appareil 3M Integrated Cyclor™

- ♦ Voir procédure «[Integrated Cyclor 3M™](#)»

Références

→ Feuillet explicatif «Simplexa™ COVID-19 Direct » Diasorin, 2020-03-17

Martine Lavergne, MD
Microbiologiste-infectiologue

Soraya Boukhoudmi, MD
Microbiologiste-infectiologue

Jean-François Boisvert, MD
Microbiologiste-infectiologue

Anais Lauzon-Laurin, MD
Microbiologiste-infectiologue

Eric Gaudreault, MD
Microbiologiste-infectiologue

Tableau de l'historique d'élaboration, révision, approbation			
	Directions, Comités, Intervenants ayant contribué		
	Noms ou acronymes	Fonctions ou description	Dates
Élaboré/rédigé par	Audrey Gaudet	Assistante-chef intérimaire en microbiologie	2020-04-16
Révisé par	Marie-Eve Ladouceur	Coordonnatrice technique en microbiologie	2020-04-16
Révisé par	Anais Lauzon-Laurin	Microbiologiste-infectiologue	2020-04-16
Approuvé par (si modifié)	Eric Gaudreault	Microbiologiste-infectiologue	2020-04-22

Tableau de l'historique des versions et modifications commentaires			
Version	Date en vigueur	Date de la dernière version	Modifications et commentaires
001	2020-04-22	2020-04-22	Version initiale

[Début](#)