

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches 	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-006
		VERSION 1.6 2020-04-17
RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

Rédigé par :	<u>Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue</u>	le :	<u>2020-03-19</u>
Vérfié par :	<u>Marie-Ève Chamberland, assistante-chef microbiologie</u> <u>Marie-Luce Lessard, technologiste de laboratoire</u>	le :	<u>2020-03-19</u>
Approuvé par :	<u>Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue</u>	le :	<u>2020-03-19</u>

1. But/Objectif

Déteeter le virus SARS-CoV-2 (agent de la COVID-19) à partir d'échantillons des voies respiratoires.

2. Principe et champs d'application

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est un système de réactifs basé sur la technologie de PCR en temps réel pour la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique au lignée B-beta-coronavirus (B-βCoV) et au coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2).

3. Documents connexes

- RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kt 1.0
- Les Manuels Techniques Abbott *m2000sp* et Abbott *m2000rt*

4. Définitions / Abréviations

- PCR: Polymerase Chain Reaction (amplification en chaîne par polymérase)
- ESB : Enceinte de sécurité biologique
- SIL: Système d'information du laboratoire

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 1 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

5. Phase pré-analytique

5.1 Spécimens acceptés

Tout spécimen respiratoire sera accepté, mais les spécimens suivants sont à préconiser :

- Écouvillonnage nasopharyngé et oropharyngé transporté dans un même tube contenant du milieu de transport universel (ou milieu équivalent)
- Expectorations
- Lavage bronchique ou lavage bronchoalvéolaire (LBA)
- Sécrétions endotrachéales
- Lavage nasopharyngé

Le volume minimal recommandé est de 1 ml.

5.2 Conservation et transport des échantillons

- Après le prélèvement, transporter et conserver les échantillons entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures ou à une température inférieure ou égale à -80°C. Éviter les cycles de gel/dégel inutiles.
- Ces échantillons doivent être conditionnés et étiquetés conformément à la législation régissant le transport d'échantillons cliniques, diagnostiques ou biologiques.
- Les spécimens prélevés de patients chez qui on suspecte une infection par le SARS-CoV-2 sont considérés comme des matières infectieuses de la catégorie B UN 3373 pour le transport.

5.3 Critères de rejet

- Écouvillons en coton
- Milieux de transport en gel ou solides
- Absence de renseignements cliniques pertinents/obligatoires : dans ce cas on inscrit « Analyse non effectuée car absence de renseignements cliniques obligatoires. »

5.4 Matériel et réactifs particuliers

- Abbott mSample Preparation Systems DNA (Réf. 06K12-24)
- Éthanol 95-100%
- RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0
 - Réactif Master Mix A
 - Réactif Master Mix B
 - Contrôle interne
 - Contrôle négatif (H₂O grade PCR; *no template control*)
 - Contrôle positif (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Abbott Master Mix Tube (Réf. 4J71-80)

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 2 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches 	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-006
		VERSION 1.6 2020-04-17
RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, transcriptase inverse, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser la transcription inverse, l'amplification par PCR et la détection de la cible ARN spécifique de B-βCoV (gène E cible), de la cible ARN spécifique de SARS-CoV-2 (gène S cible) ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

ATTENTION :

Maximum de 92 échantillons par plaque car 4 contrôles (2 positifs et 2 négatifs).

Maximum de 83 échantillons (excluant les 4 contrôles) avec une seule boîte de 96 tests de la trousse RealStar SARS-CoV-2. Plus d'une boîte est nécessaire pour analyser 92 échantillons.

5.5 Conservation du matériel

- Tous les composants doivent être conservés entre -15°C et -80°C dès leur livraison.
- **Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (pas plus de 3, pas plus de 4 pour le contrôle interne) car cela peut affecter les performances du test. Inscrive une marque sur les tubes après chaque utilisation.** Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle en plus petites quantités.
- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master mix A et le Master mix B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

6. Phase analytique / instructions techniques

6.1 Résumé de la procédure

(Pour obtenir une description détaillée de l'exécution d'un protocole Abbott *m2000sp*, se reporter au Manuel Technique Abbott *m2000sp*, Chapitre « Mode opératoire ».)

6.2	<p>Mettre des gants et s'ils ne sont pas déjà réfrigérés, sortir d'avance les échantillons congelés à tester et les laisser dégeler entre 2 et 8°C ou à température ambiante sous l'enceinte de sécurité biologique (ESB) utilisée pour la préparation des échantillons. Une fois dégelés, l'extraction devra débuter en moins de 2 heures s'ils ont été dégelés à température ambiante ou en moins de 24 heures s'ils ont été dégelés et entreposés entre 2 et 8°C.</p> <p>Mettre les échantillons dans un bain-marie à 70°C pendant 15 minutes (ou 90°C pendant 2 minutes) pour inactiver les virus (le niveau d'eau ne doit pas dépasser la hauteur du portoir). Alternativement 2 ml d'échantillon peuvent être transférés dans un tube conique 2 ml sous ESB et ces tubes peuvent ensuite être mis dans un bloc chauffant à 70°C pendant 15 minutes (ou 90°C pendant 2 minutes) pour inactiver les virus.</p> <p>*** Changer de gants car du matériel potentiellement contaminé vient d'être manipulé. ***</p>
6.3	Sortir le contrôle interne et le contrôle positif du congélateur et les laisser dégeler au réfrigérateur (entre 2 et 8°C).

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 3 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

6.4	Mettre des gants et nettoyer la surface de travail avec ELIMINase® suivi d'éthanol 70%.
6.5	<p>Procéder à la préparation des échantillons inactivés :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ N.B. : Un volume minimal de 900 µl est requis pour procéder à l'analyse. Si le volume est insuffisant il faut compléter avec de la saline stérile pour arriver à 900 µl. ▪ Mélanger par vortex 2 à 3 secondes chaque échantillon juste avant le pipetage. ▪ Si des échantillons sont turbides/opaques, ils doivent d'abord être centrifugés à haute vitesse. ▪ Pour les expectorations ou les sécrétions bronchiques muqueuses, diluer l'échantillon 1:2 avec de l'UTM (ou de la saline en absence d'UTM), mélanger par vortex, passer l'échantillon à travers une seringue pour le liquéfier, et centrifuger l'échantillon. ▪ Avec une pipette de transfert en plastique 1 ml mettre environ 1 mL d'échantillon dans un récipient à réaction (« Reaction Vessel » ou équivalent, code produit 04J71-20), et mettre le bouchon sur le tube (ou du film plastique de paraffine comme le Parafilm). <ul style="list-style-type: none"> ○ Voir le fichier « Méthode_pooling_SARS-CoV-2_m2000_HDL.docx » pour la méthode de regroupement (<i>pooling</i>) des échantillons. ▪ Préparer les tubes contrôles positifs en ajoutant 75 µl du contrôle positif de la trousse (tube à bouchon rouge) dans 850 µl d'eau grade PCR et 75 µl du contrôle positif maison (pool d'échantillons) dans 850 µl d'eau grade PCR. Mélanger par vortex 2 à 3 secondes ou doucement par inversion (5 à 10 fois). ▪ *** Remettre immédiatement le tube contrôle positif au congélateur s'il n'est pas vide et inscrire le chiffre 1 sur le tube après la première utilisation. *** ▪ Préparer les tubes contrôles négatifs en ajoutant 1 ml d'eau grade PCR dans chaque tube. ▪ Placer le contrôle positif de la trousse (accolé à un contrôle négatif) en dernier dans le dernier portoir, et placer le contrôle positif maison (accolé à l'autre contrôle négatif) de façon aléatoire dans un autre portoir. ▪ Si les tubes ne sont pas mis immédiatement dans le <i>m2000sp</i> pour débiter l'extraction, ils peuvent être conservés entre 15-30°C jusqu'à 2 heures (ne pas dépasser 2 heures). ▪ Nettoyer à nouveau la surface de travail avec ELIMINase® suivi d'éthanol 70%. ▪ Se déplacer vers la zone 3 avec les échantillons, les tubes contrôles positif et négatif ainsi que la quantité nécessaire de contrôle interne (250 µl par bouteille de lyse, voir tableau 1).
6.6	<p>*** Les étapes 6.6 à 6.8 sont à faire <u>une fois par jour</u> (maintenance quotidienne). ***</p> <p>*** Pour les extractions subséquentes dans la même période de 24 heures seul un rinçage extensif (« extensive flush ») est nécessaire. ***</p> <p>Retirer les composants suivants du <i>m2000sp</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ portoirs d'échantillons ▪ portoirs de réactifs ▪ portoirs d'embouts
6.7	<p>Nettoyer délicatement la surface intérieure du <i>m2000sp</i> par étape :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ H₂O déionisée

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 4 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ lingettes d'eau de Javel 0.1% ▪ H₂O déionisée ▪ éthanol 70% <p>*** Changer de gants car du matériel potentiellement contaminé vient d'être manipulé. ***</p>
6.8	<p>Procéder à la maintenance quotidienne du m2000sp (première utilisation du jour)</p> <p>S'authentifier sur l'ordinateur du m2000sp et choisir les onglets suivants : <i>Système → Procédures de maintenance → Maintenance quotidienne (« m2000sp daily maintenance procedure »)</i> Cliquez sur « Configurer l'analyse », fermer la fenêtre d'information, et cliquer sur « Démarrer ».</p> <p>Première étape (1 de 4) : Réglage et vérification des composants servant à la manipulation des liquides</p> <p>Ouvrir le panneau de sécurité et effectuer la procédure suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Resserrer les seringues, sans force excessive. ▪ Resserrer les vis des pistons et les raccords de vannes, sans force excessive. ▪ Vérifier et resserrer les raccords des tubulures, sans force excessive. ▪ Vérifier que les tubulures ne présentent ni fuite, ni bouchon, ni pliure. ▪ Lorsque terminé, cliquer sur « Reprendre ». <p>Deuxième étape (2 de 4) : Nettoyage des cônes pour embouts à usage unique</p> <p>Ouvrir le panneau de sécurité et effectuer la procédure suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Nettoyer les cônes pour embouts à usage unique et les prolongateurs de tubulures. ▪ Lorsque terminé, fermer le panneau de sécurité et cliquer sur « Reprendre ». <p>Troisième étape (3 de 4) : Nettoyage du plan de travail</p> <p>Ouvrir le panneau de sécurité et effectuer la procédure suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Si non déjà fait, nettoyer le panneau de sécurité, la surface de travail (normalement fait à l'étape 6.1), la plateforme de déchargement, et la station de déchets. ▪ Vérifier les poubelles de déchets solides et de déchets liquides et les vider au besoin. ▪ Vérifier le contenant de liquide système et le remplir au besoin. ▪ Lorsque terminé, fermer le panneau de sécurité et cliquer sur « Reprendre ». <p>*** Changer de gants car du matériel potentiellement contaminé vient d'être manipulé. ***</p> <p>Quatrième étape (4 de 4) : Rinçage du système</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Une purge des voies liquides s'effectue automatiquement. Une fois le rinçage terminé, cliquer sur « Terminer le

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 5 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

	<p>processus ».</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Si présence de bulles significatives dans les tubulures ou seringues, procéder à un rinçage extensif (« extensive flush »). ▪ Vérifier le niveau de liquide H₂O et les déchets. ▪ Replacer les portoirs d'embouts. <p>*** Le rinçage extensif (« extensive flush ») est à faire pour chaque extraction subséquente dans la période de 24 heures. ***</p>
6.9	Charger les tubes d'échantillons sur les portoirs d'échantillons.
6.10	Placer les portoirs d'échantillons dans le <i>m2000sp</i> de droite à gauche, en prenant soin de placer en dernier (à gauche) le portoir non plein, le cas échéant.
6.11	Placer dans le <i>m2000sp</i> les 3 plaques à puits profonds et les 2 plaquettes à embouts.
6.12	<p>Démarrer la procédure d'extraction :</p> <p>Cliquer sur l'onglet « Demandes », puis sur « Extraction de l'échantillon ».</p> <p>Sélectionner « <u>m2000-RNADNA-LL-500-90-v022420</u> », et cliquer sur « Configurer l'analyse ».</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour procéder à l'extraction à l'aide d'une trousse Abbott <i>mSample Preparation Systems RNA</i> (Réf. 04J70-24), voir annexe 2
6.13	Inscrire le numéro de lot et la date d'expiration aux endroits correspondants, et cliquer sur suivant.
6.14	Une lecture des codes-barres s'effectue. Effectuer les corrections au besoin (on peut entrer à la main le code d'un échantillon clinique). Cliquer sur « suivant » si tout est conforme, ou effectuer les corrections le cas échéant.
6.15	Placer les cupules réactionnelles <u>SOUS</u> le plastique blanc, tel qu'indiqué à l'écran.
6.16	Vérifier les embouts, et effectuer le chargement dans l'appareil tel qu'indiqué à l'écran. S'assurer que la disposition des embouts à l'écran est conforme (porter une attention particulière aux portoirs d'embouts déjà entamés. Mettre à jour, et si la disposition à l'écran est conforme, cliquer sur « Suivant ».
6.17	Identification de la plaque à puits profonds : taper la date du jour au format AAAAMMJJ et ajouter la lettre S (SARS), ainsi que le chiffre pour indiquer de quel lot du jour il s'agit (ex. : 20200319S1). Inscrire le numéro de lot des réactifs.
6.18	<p>*** Changer de gants car du matériel potentiellement contaminé vient d'être manipulé. ***</p> <p>Préparer les réactifs d'extraction (voir tableau pour les quantités requises) :</p>

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 6 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches 	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-006
		VERSION 1.6 2020-04-17
RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

Nb échantillons (incluant contrôles)	Lyse position 1 (éthanol inclus)		Lyse position 2 (éthanol inclus)		Microparticules	Solution de lavage #1	Solution de lavage #2	Tampon d'éluion
	Lyse	CI	Lyse	CI				
1 à 24	65 mL	250 µl	/	/	1	1	1	1
25 à 48	130 mL	500 µl	/	/	1	1	1	1
49 à 72	130 mL	500 µl	65 mL	250 µl	1	2	2	1
73 à 96	130 mL	500 µl	130 mL	500 µl	1	2	2	1

- Ajouter les quantités suivantes d'éthanol 95-100% non dénaturant à chacune des bouteilles :
 - *mLysisDNA* : 35 ml par bouteille
 - *mWash1DNA* : 23 ml par bouteille
 - *mWash2DNA* : 70 ml par bouteille
- ATTENTION : ne pas ajouter le contrôle interne tout de suite dans le tampon de lyse.
- Mesurer la quantité requise de *mLysisDNA* (incluant éthanol) dans un cylindre gradué, et transvider la quantité requise dans un contenant vide de *mLysisDNA* (maximum 130 ml par bouteille). Conserver toute quantité résiduelle de *mLysisDNA* mélangé avec éthanol dans son contenant original et bien identifier sur le contenant que l'éthanol a déjà été ajouté. Ce contenant servira à préparer la prochaine extraction.
- Mélanger doucement par inversion le contrôle interne (tube à bouchon vert).
- À l'aide de la **pipette dédiée au contrôle interne**, ajouter la quantité de contrôle interne (« Internal Control » ou IC) **dans chaque contenant** de solution de lyse (voir tableau 1). **Mélanger doucement par inversion pendant 3 minutes.**
- Bien mélanger doucement **par inversion** (5 à 10 fois) chaque bouteille de réactif pour s'assurer que les solutions sont homogènes.
- **Agiter doucement et mélanger par rotation les microparticules** jusqu'à ce que le mélange soit homogène, juste avant de les transférer dans leur contenant respectif à l'étape suivante.

6.19 Transférer les réactifs dans leurs contenants en plastique identifiés par un logo correspondant, et placer ces contenants dans le portoir à l'endroit identifié par un logo correspondant. Replacer le portoir dans l'appareil.
Enlever les bulles avec une pipette de transfert en plastique.

6.20

- Cliquer sur « Lecture » pour vérifier les codes-barres et les volumes des réactifs.
- Cliquer ensuite sur « Démarrer ».
- *** Remettre immédiatement le tube contrôle interne au congélateur s'il n'est pas vide et inscrire le chiffre 1 sur le tube après la première utilisation. ***
- Une fois le processus d'extraction terminé, cliquer sur « Fermer le processus » dans la colonne de gauche afin de passer à la prochaine étape.

***** Délai maximal à respecter entre la fin de l'extraction et l'étape suivante : une heure. *****

- Environ 30 minutes avant la fin de l'extraction sortir les réactifs « master mix A et B » du congélateur pour les

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 7 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	---	---------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

	mettre à température pièce.			
6.21	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Préparation du « Master mix » (Panel II), environ 5-10 minutes avant la fin de l'extraction automatisée (m2000sp ou autre automate) : <ul style="list-style-type: none"> ○ ATTENTION : Ne pas mélanger 2 lots de <i>master mix</i> différents. ○ Mélanger par vortex 3-5 secondes le tube « Master A » (bouchon bleu) et le tube « Master B » (bouchon mauve). ○ Centrifuger 3000 tr/min 30 secondes. ○ Dans un tube réactionnel (« <i>Master mix tube</i> » ou équivalent), mettre les quantités adéquates du « Master A » et du « Master B », selon le nombre d'échantillons à tester (en incluant les contrôles pos. et nég.) → voir annexe 1 ○ Mélanger à nouveau par vortex 3-5 secondes. <p>N.B. Une boîte de 96 tests de la trousse RealStar SARS-CoV-2 contient assez de réactifs pour analyser 83 échantillons + les 4 contrôles, en tenant compte du 10% de perte. Plus d'une boîte est nécessaire pour analyser 92 échantillons (plaque pleine avec 4 contrôles).</p> <p>*** Remettre immédiatement les tubes « Master A » et « Master B » au congélateur s'ils ne sont pas vides et inscrire le chiffre 1 sur les tubes après la première utilisation. ***</p>			
6.22	<p>S'authentifier sur l'ordinateur du <i>m2000rt</i>, allumer l'appareil, et cliquer sur « Démarrer ».</p> <p>(La lampe de l'appareil requiert environ 15 minutes pour se réchauffer.)</p>			
6.23	<p>Ajout du mélange réactionnel (« <i>mastermix</i> ») :</p> <p>*** Pour l'ajout manuel du mélange réactionnel (si autre méthode d'extraction), voir annexe 5 ***</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sur l'ordinateur du <i>m2000sp</i>, cliquer sur l'onglet « Demandes », puis sur « Addition du <i>mastermix</i> ». ▪ À l'écran, sélectionner la plaque (toujours celle du haut), et vérifier la date du jour. ▪ Cliquer ensuite sur « configurer l'analyse » et puis cliquer sur « suivant ». ▪ Identification de la plaque PCR : taper la date du jour au format AAAAMMJJ et ajouter la lettre S (SARS), ainsi que le chiffre pour indiquer de quel lot du jour il s'agit (ex. : 20200319S1). ▪ Cliquer ensuite sur « Master Mix Addition 10e20m », placer la plaque PCR et cliquer sur suivant. ▪ Vérification des déchets. <p>Changer de gants car du matériel potentiellement contaminé vient d'être manipulé.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vérifier les embouts, et effectuer le chargement dans l'appareil tel qu'indiqué à l'écran. S'assurer que la disposition des embouts à l'écran est conforme (porter une attention particulière aux portoirs d'embouts déjà entamés). ▪ Mettre à jour, et si la disposition à l'écran est conforme, cliquer sur « Suivant ». ▪ Sélectionner le nom du réactif « Master A ». ▪ Inscrire le numéro de lot du réactif et la date de péremption. 			
Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 8 sur 21

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sélectionner le volume conforme au dosage : 10(10)/20 et cliquer sur « suivant ». ▪ Vérifier la disposition des échantillons. Si tout est conforme cliquer sur « suivant ». ▪ Mettre le tube de <i>master mix</i> à l'endroit indiqué, fermer la porte et cliquer sur « suivant ». ▪ Cliquer sur « Démarrer » et s'assurer d'avoir démarré le m2000rt pour qu'il se réchauffe. ▪ Une fois le processus terminé les témoins lumineux clignoteront au-dessus de l'appareil. ▪ Cliquer sur « Fermer le processus ». ▪ Bien sceller la plaque PCR.
6.24	<p>Procéder à l'amplification :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ouvrir le tiroir du <i>m2000rt</i> et, en prenant soin de toujours la tenir par les côtés, y insérer la plaque PCR. ▪ Dans l'onglet « Demande d'analyse », cliquer sur « Importer et configurer ». ▪ Sélectionner la bonne plaque PCR et cliquer sur suivant. ▪ Cliquer ensuite sur « Suivant » à 2 reprises et cliquer sur « Fermer ». ▪ Sélectionner « RealStar SARS-CoV-2 LDA » et cliquer sur « Suivant ». ▪ Inscrire le numéro de lot, ne rien inscrire dans les informations relatives au contrôle et cliquer sur suivant à 2 reprises. ▪ Sélectionner les puits contrôles un à un, modifier le type d'échantillon pour « contrôle » et changer l'identification pour « pos1 » pour le contrôle positif de la trousse, « pos2 » pour le contrôle positif maison, « neg1 » et « neg2 » pour le contrôles négatifs. ▪ Cliquer sur « Suivant » à 2 reprises et puis cliquer sur « Démarrer ».
6.25	<p>Jeter dans un contenant de plastique les restes de réactifs liquides présents dans l'appareil <i>m2000sp</i>. Ne jamais jeter ces réactifs dans l'évier.</p>
6.26	<p>Retirer les tubes d'échantillons du <i>m2000sp</i> et les remettre sur leur portoir original, et retirer la plaque à puits profonds du <i>m2000sp</i>. Conserver au réfrigérateur les tubes d'échantillons et la plaque à puits profonds en attendant la fin de l'analyse sur le <i>m2000rt</i>.</p>
6.27	<p>Nettoyer les portoirs à échantillons du <i>m2000sp</i> avec des lingettes d'eau de Javel.</p>
6.28	<p>Lorsque l'analyse est complétée sur le <i>m2000rt</i>, sortir la plaque et la mettre dans un sac biorisque avant de la jeter dans la poubelle identifiée à cet effet.</p>

7. Phase post-analytique

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 9 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	---------------

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches 	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-006
		VERSION 1.6 2020-04-17
RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

7.1 Rapports/Résultats

Canal de détection			Interprétation des résultats	Rapport
FAM	Cy5	JOE		
+	+	+*	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) et au SARS-CoV-2 (gène S cible) détecté.	Virus SARS-CoV-2 détecté Analyse effectuée avec une trousse non homologuée par Santé Canada Maladie à déclaration obligatoire : déclaration faite par le laboratoire
+†	-	+*	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) détecté. Si Ct ≥ 37 voir commentaire**.	
-	+†	+*	ARN spécifique au SARS-CoV-2 (gène S cible) détecté. Si Ct ≥ 37 voir commentaire**.	
-	-	+	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) ou au SARS-CoV-2 (gène S cible) non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) ou au SARS-CoV-2 (gène S cible).	Virus SARS-CoV-2 non détecté Analyse effectuée avec une trousse non homologuée par Santé Canada. 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.
-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs.	Voir section « Code d'erreur »

Il y a plusieurs types de résultats possibles :

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™ ou Cy5. De fortes charges en ARN spécifique de B-βCoV (gène E cible) et/ou de SARS-CoV-2 (gène S cible) dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

† Les sensibilités des systèmes de détection des cibles B-βCoV (FAM™) et SARS-CoV-2 (Cy5) étant légèrement différentes, des échantillons faiblement positifs peuvent, dans de rares cas, présenter un signal dans le canal FAM™ et non dans le canal Cy5, ou vice versa.

** Si une seule cible est détectée avec un Ct supérieur ou égal à 37 :

- Envoyer au LSPQ pour confirmation si la courbe est logarithmique (courbe typique, voir exemples à aux annexes 4 et 5), avec commentaire « Échantillon expédié au LSPQ pour confirmation »;
- Si la courbe n'est pas logarithmique (courbe atypique), le résultat devrait être rapporté négatif mais consulter le microbiologiste de garde au laboratoire pour déterminer si la reprise de l'analyse ou si un nouvel échantillon est nécessaire.

Expédier 500 µl d'échantillon au LSPQ lorsqu'une confirmation est requise, en suivant ces étapes :

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 10 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

1. Envoyer un courriel à l'adresse distribution.centrale@inspq.qc.ca;
 - a. Inscrire dans l'objet : CONFIRMATION – COVID-19;
 - b. Inscrire le nombre d'échantillons;
2. Apposer une étiquette visible sur la boîte stipulant CONFIRMATION (ne pas inscrire COVID);
3. Remplir PHAGE en choisissant le test **Coronavirus (SARS-CoV-2, COVID-19) : détection (TAAN) sur spécimen clinique**
4. Inscrire en gros au bas de PHAGE : CONFIRMATION
5. Si un échantillon ne peut être envoyé au LSPQ (ex. : volume résiduel insuffisant), ajouter le message : « Un problème technique nous empêche de procéder au test de confirmation. Selon la suspicion clinique, il est suggéré de soumettre un nouvel échantillon. »

→ **Conserver les échantillons positifs à -80°C**

Code d'erreur

Un code d'erreur sera généré en cas d'inhibition complète ou partielle mais significative (contrôle interne avec Ct supérieur à 38). Si un code d'erreur d'inhibition est généré pour un spécimen, centrifuger l'échantillon, diluer le surnageant 1:10 et reprendre l'analyse (**900 µl d'eau PCR + 100 µl d'échantillon**, et ensuite procéder à l'extraction et à l'amplification comme pour un spécimen non dilué). Si un spécimen est trop muqueux et génère une erreur de pipetage, centrifuger le spécimen et reprendre l'analyse.

Si un résultat négatif valide est obtenu après dilution, ajouter le message « }INHI » au rapport : « Attention : en raison de la présence de substances inhibitrices, ce résultat a été obtenu après dilution du spécimen, ce qui peut entraîner une diminution de la sensibilité de l'analyse. »

Si malgré tout cela l'inhibition persiste, aviser le microbiologiste et inscrire le message « }INHE » au rapport.

7.2 Intervalles de référence

N/A

7.3 Interprétation des résultats

DéTECTÉ = positif Non détecté = négatif

ATTENTION : Veuillez vérifier les courbes d'amplification de tous les échantillons réactifs ou avec code d'erreur et montrer à un microbiologiste toute courbe avec un aspect atypique (voir annexes 4 et 5).

7.4 Valeurs critiques

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 11 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches  Québec	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-006
		VERSION 1.6 2020-04-17
RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

L'infection à SARS-CoV-2 (agent de la COVID-19) est une maladie à déclaration obligatoire, à déclarer immédiatement à la santé publique régionale par faxe et par téléphone (les appels doivent se faire entre 8h30 et 21h00).

Il s'agit d'une valeur critique : il faut appeler immédiatement le médecin traitant (ou le personnel infirmier de l'unité pour les patients hospitalisés) et faxer le rapport sur l'unité. On avise aussi le service de prévention des infections.

Pour les travailleurs de la santé il faut appeler et faxer le rapport au service santé et sécurité des travailleurs.

7.5 Spécification des performances

Non disponible

7.6 Entretien et calibration

Voir les chapitres « Maintenance » dans les manuels techniques Abbott *m2000sp* et Abbott *m2000rt*.

8. Restrictions et/ou notes spéciales

N/A

9. Précautions de sécurité

Veuillez vous référer au « Manuel de sécurité des laboratoires ».

10. Références

1. Notice RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0
2. Manuels techniques Abbott *m2000sp* et Abbott *m2000rt*
3. Coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19); détection (TAAN) sur spécimen clinique, répertoire des analyses du LSPQ (consulté le 18 mars 2020) : <https://www.inspq.gc.ca/lspq/repertoire-des-analyses/coronavirus-sars-cov-2/covid-19-detection-taan-sur-specimen-clinique>
4. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Testing, Public Health Ontario (consulté le 18 mars 2020) : <https://www.publichealthontario.ca/en/laboratory-services/test-information-index/wuhan-novel-coronavirus>
5. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions, and chemical reagents. *Jpn J Vet Res.* 2004 Nov;52(3):105-12.
6. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfus Med Rev.* 2020 Feb 21. pii: S0887-7963(20)30014-6.
7. *Nat Commun.* 2019 Dec 18;10(1):5770.
8. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande urgente sur certains risques liés au COVID-19; Avis Anses Saisine n° 2020-SA-0037, 9 mars 2020
9. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. *Transfusion.* 2006 Oct;46(10):1770-7.
10. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. Chin A et al. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.20036673>
11. SARS-CoV-2 : guide pratique pour les demandes d'analyses de laboratoire en lien avec la COVID-19. Laboratoire de santé publique du Québec. Version 1 ; 6 avril 2020.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 12 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	<p>PON-M-BM-LEV-006</p>
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

11. Historique des versions

Version	Rédigé par :	Raison de la révision	Entrée en vigueur
01	Jeannot Dumaresq	-	19 mars 2020
02	Jeannot Dumaresq	<p>Section 6.9 : retrait de la nécessité de travailler échantillons sous ESB car déjà inactivés; et modification du volume minimal d'échantillon requis à 900 µl car modification du protocole d'extraction; précision concernant les volumes d'échantillons insuffisants : on doit ajouter de la saline stérile pour compléter à 900 µl</p> <p>Section 6.13 : modification du protocole d'extraction pour le « HCV 0.5 ml »</p> <p>Sections 6.18 et 6.27 : modification de la façon de nommer les plaques</p> <p>Section 7.1 : retrait du commentaire concernant les regroupements d'échantillons (pools); précision concernant l'envoi pour confirmation des pos au LSPQ : on envoie les éluats en le spécifiant; conserver les échantillons positifs à -80°C</p>	20 mars 2020
03	Jeannot Dumaresq	<p>Section 6.9 : mention du document « Méthode_pooling_SARS-CoV-2_m2000_HDL.docx » pour la méthode de regroupement (pooling) des échantillons, si nécessaire</p> <p>Section 6.13 : référence à l'annexe 3 pour procéder à l'extraction avec la trousse Abbott mSample Preparation Systems DNA</p> <p>Ajout annexe 3</p> <p>Ajout de références concernant l'inactivation des coronavirus</p>	23 mars 2020
04	Jeannot Dumaresq	<p>Plusieurs modifications effectuées pour optimiser le flux du travail et mieux ordonner le travail</p> <p>Section 5.1 : volume minimal recommandé de 1 ml</p> <p>Section 6.2 : ajout d'une option d'inactivation (70°C pendant 10 minutes)</p> <p>Section 6.21 : modification du volume de contrôle interne pour 250 au lieu de 200 µl car le contrôle interne est souvent inhibé avec les échantillons positifs et cela crée trop de messages d'erreur complexifiant la validation</p> <p>Section 7.1 : retrait du commentaire d'envoi au LSPQ car la confirmation n'est plus nécessaire après 15 échantillons confirmés au LSPQ; modification du commentaire du résultat positif (déclaration faite); ne pas envoyer éluat au LSPQ mais 500 µl d'échantillon si confirmation requise; ajout d'instructions si une seule cible est détectée avec Ct supérieur ou égal à 37</p> <p>Section 7.4 : imprimer/faxer et appeler pour résultats positifs</p> <p>Ajout annexes 4 et 5</p>	
05	Jeannot Dumaresq	<p>5.2 : échantillons : éviter les cycles de gel/dégel inutiles</p> <p>5.4 : maintenant 92 échantillons max par plaque (83 échantillons max par boîte de 96 tests) car maintenant 4 contrôles (2 pos, 2 neg)</p>	7 avril 2020

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 13 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	<p>PON-M-BM-LEV-006</p>
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

Version	Rédigé par :	Raison de la révision	Entrée en vigueur
		<p>5.5 : ne pas dépasser plus de 3 cycles de gel-dégel avec les réactifs</p> <p>6 : ajout de précision concernant la conservation des contrôles</p> <p>6.2 : Modification de la méthode d'inactivation : 70°C x 15 minutes (ou 90°C x 2 minutes), car échantillons complets sont inactivés (gros volume 2-3 ml) et ça peut prendre 3-4 minutes avant d'atteindre le 70°C au centre de l'échantillon)</p> <p>6.5 : centrifuger les échantillons turbides; ajout méthode préparation expectorations et sécrétions bronchiques muqueuses; les échantillons sont maintenant transférés dans des récipients à réaction (« Reaction Vessel » ou équivalent, code produit 04J71-20); les tubes contrôles post et neg sont maintenant préparés avant l'extraction pour subir l'extraction comme les échantillons; on utilise maintenant 2 ctrl pos (75 µl ds 850 µl d'eau) et 2 ctrl nég; mélanger le tube contrôle positif avec dilution (vortex ou inversion); précision concernant l'emplacement des contrôles dans les portoirs</p> <p>Suppression étape 6.9 (incorporée à 6.8)</p> <p>Fusion étapes 6.18 et 6.19</p> <p>Suppression étape 6.20 (incorporée à 6.5)</p> <p>6.18 (anciennement 6.20) : Mélanger doucement par inversion pendant <u>3 minutes</u> les bouteilles de tampon de lyse après l'ajout du contrôle interne.</p> <p>6.20 (anciennement 6.23) : sortir réactifs du congélateur 30 min avant fin extraction au lieu de 1h30, et laisser dégeler à TP</p> <p>6.21 (anciennement 6.24) : sortir les réactifs de master mix 30 min avant fin extraction automatisée, vortexer chaque tube de master mix (+ centrifugation) et vortexer à nouveau une fois mélangés (+ centrifugation), préparer le mélange dans un tube « Master mix » ou équivalent pour faire l'addition dans le m2000sp, remettre immédiatement après les réactifs au congélateur si pas vides</p> <p>6.24 (anciennement 6.27) : précision sur la nomenclature des contrôles</p> <p>6.26 (anciennement 6.29) : conserver tubes et plaque puits profonds au réfrigérateur en attendant fin analyse m2000rt</p> <p>7.1 : modification message de déclaration: « Maladie à déclaration obligatoire : déclaration faite par le laboratoire »; lorsque SARS-CoV-2 non détecté, ajout du message « 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. »; retrait de l'étape de congélation en cas d'inhibition → on passe directement à la dilution 1:10 mais on centrifuge d'abord l'échantillon; on centrifuge aussi pour les échantillons trop muqueux avec erreur de pipettage; message }INHE au rapport si inhibition malgré dilution</p> <p>7.4 : précisions concernant appels et faxes à effectuer pour les résultats positifs; aviser service de prévention des infections pour pts hospitalisés</p>	

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Véifié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 14 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec </p>	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-LEV-006
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

Version	Rédigé par :	Raison de la révision	Entrée en vigueur
		<p>10 : ajout de références pour l'inactivation thermique</p> <p>Suppression de l'annexe 2 et renumérotage des annexes</p> <p>Programme d'amplification/détection sur le m2000rt modifié le 5 avril 2020 : retrait de la lecture du fluorophore de référence (ROX) en raison des courbes ondulées, et modification valeur Autothreshold de 30 à 10</p>	
06	Jeannot Dumaresq	<p>5.5 : 4 cycles de gel/dégel sont permis pour des raisons logistiques (pour éviter les pertes, et éviter aliquotages inutiles)</p> <p>5.6 : retrait du tableau 1 → intégré à la section 6.18</p> <p>6.18 : modification pour utiliser la trousse d'extraction mSample <u>DNA</u> (les instructions pour la trousse mSample RNA sont maintenant à l'annexe 2)</p>	17 avril 2020

Nom du fichier informatique : RealStar SARS-CoV-2 PCR (m2000) - PON-M-BM-06_V1.6

Ce document est approuvé par le Chef de service.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 15 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

Annexe 1: calculs des réactifs

STATUT : APPROUVÉE

Nb d'échantillons cliniques à tester	Nb de contrôles	Master A (bouchon bleu) Volume requis (µl) + 10%	Master B (bouchon mauve) Volume requis (µl) + 10%	Volume total (µl)	Nb d'échantillons cliniques à tester	Nb de contrôles	Master A (bouchon bleu) Volume requis (µl) + 10%	Master B (bouchon mauve) Volume requis (µl) + 10%	Volume total (µl)
1	2	16,5	49,5	66	48	2	275,0	825,0	1100
2	2	22,0	66,0	88	49	2	280,5	841,5	1122
3	2	27,5	82,5	110	50	2	286,0	858,0	1144
4	2	33,0	99,0	132	51	2	291,5	874,5	1166
5	2	38,5	115,5	154	52	2	297,0	891,0	1188
6	2	44,0	132,0	176	53	2	302,5	907,5	1210
7	2	49,5	148,5	198	54	2	308,0	924,0	1232
8	2	55,0	165,0	220	55	2	313,5	940,5	1254
9	2	60,5	181,5	242	56	2	319,0	957,0	1276
10	2	66,0	198,0	264	57	2	324,5	973,5	1298
11	2	71,5	214,5	286	58	2	330,0	990,0	1320
12	2	77,0	231,0	308	59	2	335,5	1006,5	1342
13	2	82,5	247,5	330	60	2	341,0	1023,0	1364
14	2	88,0	264,0	352	61	2	346,5	1039,5	1386
15	2	93,5	280,5	374	62	2	352,0	1056,0	1408
16	2	99,0	297,0	396	63	2	357,5	1072,5	1430
17	2	104,5	313,5	418	64	2	363,0	1089,0	1452
18	2	110,0	330,0	440	65	2	368,5	1105,5	1474
19	2	115,5	346,5	462	66	2	374,0	1122,0	1496
20	2	121,0	363,0	484	67	2	379,5	1138,5	1518
21	2	126,5	379,5	506	68	2	385,0	1155,0	1540
22	2	132,0	396,0	528	69	2	390,5	1171,5	1562
23	2	137,5	412,5	550	70	2	396,0	1188,0	1584
24	2	143,0	429,0	572	71	2	401,5	1204,5	1606
25	2	148,5	445,5	594	72	2	407,0	1221,0	1628
26	2	154,0	462,0	616	73	2	412,5	1237,5	1650
27	2	159,5	478,5	638	74	2	418,0	1254,0	1672
28	2	165,0	495,0	660	75	2	423,5	1270,5	1694
29	2	170,5	511,5	682	76	2	429,0	1287,0	1716
30	2	176,0	528,0	704	77	2	434,5	1303,5	1738
31	2	181,5	544,5	726	78	2	440,0	1320,0	1760
32	2	187,0	561,0	748	79	2	445,5	1336,5	1782
33	2	192,5	577,5	770	80	2	451,0	1353,0	1804
34	2	198,0	594,0	792	81	2	456,5	1369,5	1826
35	2	203,5	610,5	814	82	2	462,0	1386,0	1848
36	2	209,0	627,0	836	83	2	467,5	1402,5	1870
37	2	214,5	643,5	858	84	2	473,0	1419,0	1892
38	2	220,0	660,0	880	85	2	478,5	1435,5	1914
39	2	225,5	676,5	902	86	2	484,0	1452,0	1936
40	2	231,0	693,0	924	87	2	489,5	1468,5	1958
41	2	236,5	709,5	946	88	2	495,0	1485,0	1980
42	2	242,0	726,0	968	89	2	500,5	1501,5	2002
43	2	247,5	742,5	990	90	2	506,0	1518,0	2024
44	2	253,0	759,0	1012	91	2	511,5	1534,5	2046
45	2	258,5	775,5	1034	92	2	517,0	1551,0	2068
46	2	264,0	792,0	1056	93	2	522,5	1567,5	2090
47	2	269,5	808,5	1078	94	2	528,0	1584,0	2112

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches</p> <p>Québec</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	PON-M-BM-06
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>Annexe 2: procédure d'extraction avec trousse à ADN (<i>mSample</i> Preparation Systems RNA)</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

Quantités requises selon le nombre d'échantillons, avec la trousse *mSample* Preparation Systems **RNA** et le protocole m2000-RNA-Plasma-LL-500-80-v102215

Nombre d'échantillons	Lyse position 1	Lyse position 2	Microparticules	Solution de lavage #1	Solution de lavage #2	Tampon d'éluion
1 à 24	1		1	1	1	1
25 à 48	2		2	2	2	2
49 à 72	2	1	2	3	3	3
73 à 94	2	2	2	4	3	3

Mélanger doucement par inversion le contrôle interne (tube à bouchon vert) et ajouter 250 µl de contrôle interne dans chaque bouteille de *mLysisRNA*. Mélanger doucement par inversion pendant 3 minutes.

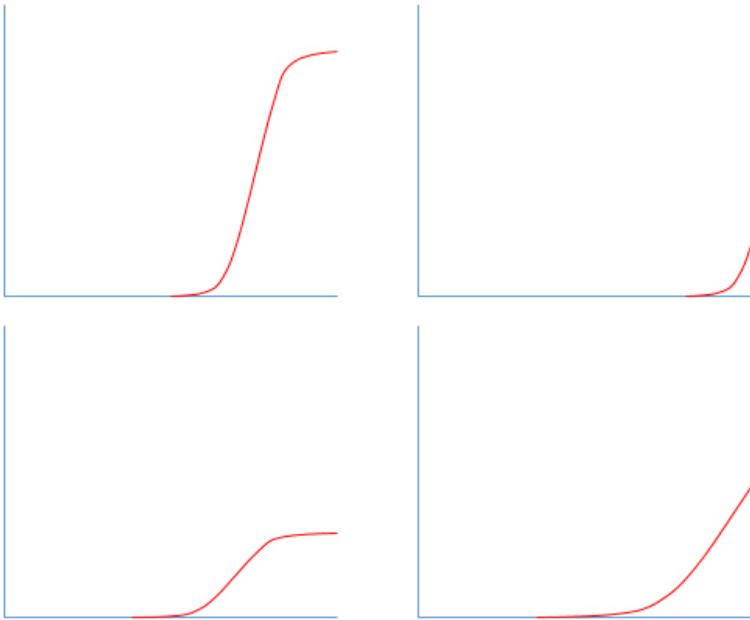
Bien mélanger par inversion (5 à 10 fois) chaque bouteille de réactif pour s'assurer que les solutions sont homogènes.

Il faut utiliser le protocole m2000-RNA-Plasma-LL-500-80-v102215 pour procéder à l'extraction, et ensuite il faut utiliser le protocole **Master Mix Addition 10e20m** pour la répartition automatisée des éluats et du *master mix* dans la plaque d'amplification.

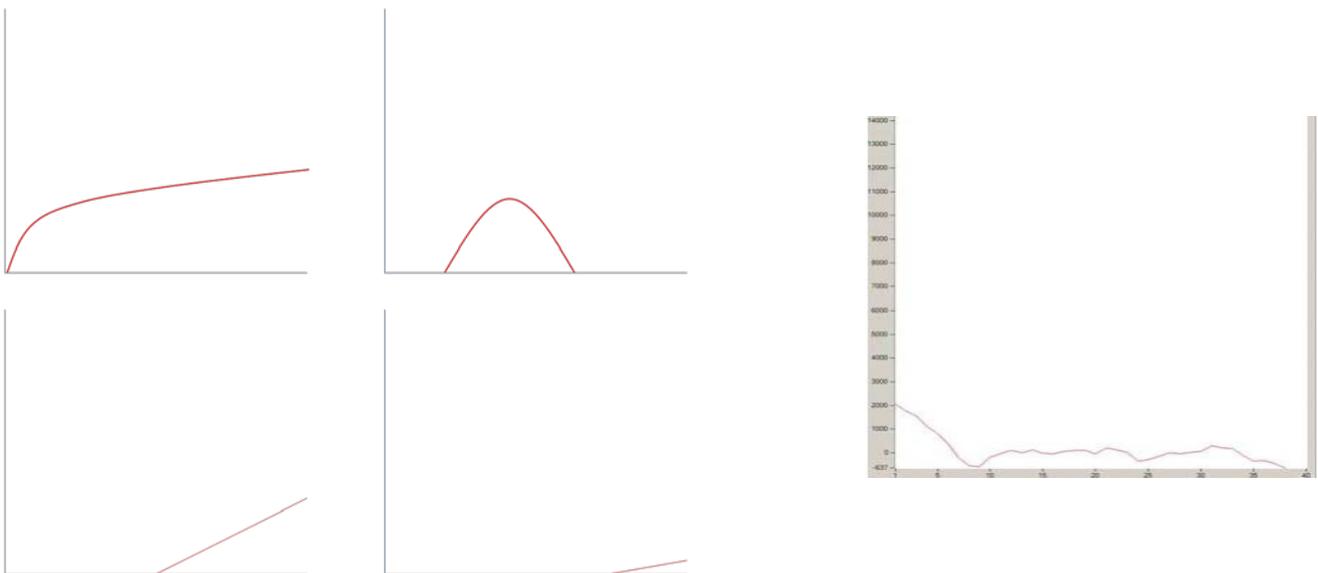
Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 17 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

<p>Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière-Appalaches</p> 	<p>ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE</p> <p>Chapitre 1 : Procédures techniques</p> <p>Section : Biologie moléculaire</p>	<p>PON-M-BM-06</p>
		<p>VERSION 1.6</p> <p>2020-04-17</p>
<p>Annexe 3: exemples de courbes d'amplification typiques (logarithmiques) vs atypiques</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉE</u></p>

Courbes considérées normales/typiques



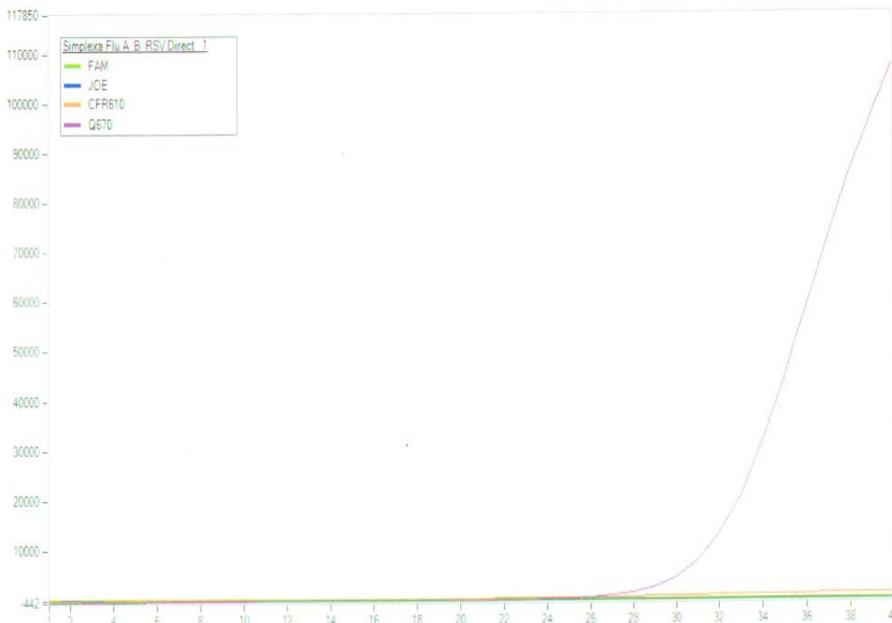
Courbes considérées anormales/atypiques



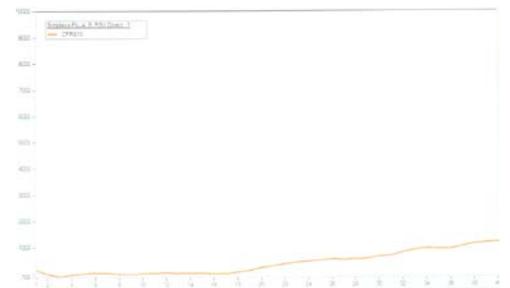
Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 18 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	---	----------------

Annexe 4: exemples de courbes tardives positives/typiques et négatives/non spécifiques

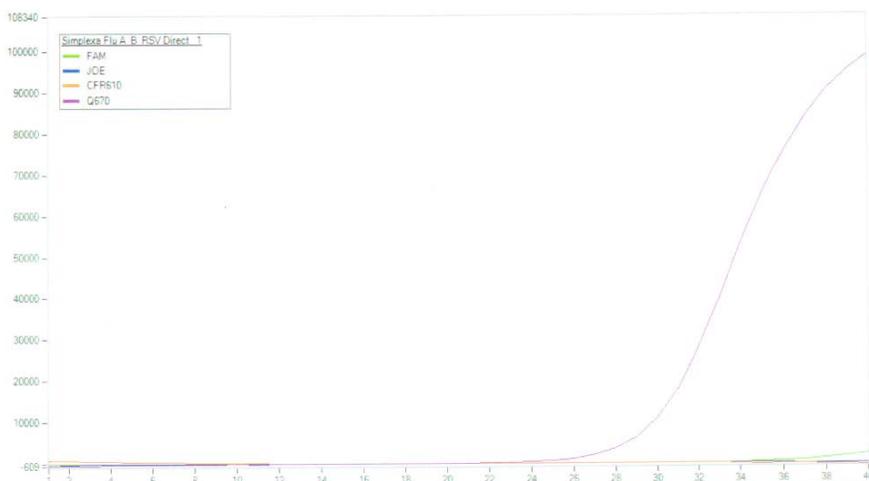
STATUT : APPROUVÉE



Courbe tardive atypique
(non logarithmique)



Courbe tardive typique
(logarithmique)



	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-06
		VERSION 1.6 2020-04-17
Annexe 5: ajout <u>manuel</u> du mélange réactionnel et création de la feuille de travail		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

Ajout du mélange réactionnel (« master mix ») :

***** **Changer de gants.** *****

Canevas plaque PCR à l'annexe 6

Cette étape se fait manuellement :

- Préparer le master mix tel que décrit à l'étape 6.22.
- Dans une plaque PCR qui sera chargée sur le *m2000rt* :
 - Dans la **zone PCR 1**, pour chaque échantillon (donc chaque patient/pool) et les 2 contrôles ajouter **20 µl** de « Master Mix » dans un puits.
 - Dans la **zone PCR 2**, ajouter dans chacun des puits **10 µl** d'échantillon préparé de la plaque à puits profonds.
 - Pour le contrôle positif : **10 µl** de contrôle + **1 µl** contrôle interne (ICD)
 - Pour le contrôle négatif : **10 µl eau PCR** + **1 µl** contrôle interne (ICD)
- Bien sceller la plaque PCR.
- Vérifier s'il y a des bulles dans le fond des puits, et le cas échéant procéder à une courte « centrifugation » de la plaque avec l'essoreuse à salade prévue à cet effet afin de faire remonter les bulles à la surface.

*** **Remettre tous les réactifs au congélateur.** ***

Procéder à la création de la feuille de travail et à l'amplification avec le *m2000rt*:

- Cliquer sur « Demandes ». Sélectionner « Demande d'analyse » et ensuite « Nouvelle demande ».
- Inscrire le nom de la plaque (le même que celui de la plaque à puits profond/extraction): taper la date du jour au format AAAAMMJJ et ajouter la lettre S (SARS), ainsi que le chiffre pour indiquer de quel lot du jour il s'agit (ex. : 20200319S1).
- Dans la section « Réactifs pour préparation de l'échantillon », inscrire le # de lot et la date de péremption de la trousse « Abbott *mSample* Preparation Systems DNA (Réf. 06K12-24) » utilisée.
- Sélectionner l'application « **RealStar SARS-CoV-2 LDA** » et cliquer sur « Suivant ».
- Dans la section « Réactifs d'analyse PCR », inscrire le # de lot et la date de péremption de la trousse de réactifs d'amplification RealStar SARS-CoV-2 utilisée et cliquer sur suivant.
- Créer la feuille de travail dans le schéma de la plaque PCR à l'écran en cliquant sur chaque carré/puits et en entrant les renseignements requis pour chaque carré/puits :
 - Type d'échantillon : « patient » ou « non utilisé » ou « contrôle »
 - Identification (ID) de l'échantillon (ex. : 1 pour patient #1, pos ou neg pour contrôle)
 - Analyses : cocher **B-betaCoV** et **SARS-CoV-2**
- Une fois la feuille de travail complétée, cliquer sur « Suivant » et ensuite sur « Terminer ».
- La feuille de travail se retrouve ensuite dans la fenêtre « Demandes d'analyses en attente ». Cliquer sur « Configurer l'analyse » et ensuite sur « Suivant ».
- Ouvrir le tiroir du *m2000rt* et, **en prenant soin de toujours la tenir par les côtés**, y insérer la plaque PCR. Fermer le tiroir et cliquer ensuite sur « Démarrer ».

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Eve Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 20 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------

Centre intégré de santé et de services sociaux de Chaudière- Appalaches 	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-06
		VERSION 1.6 2020-04-17
Annexe 6: canevas plaque PCR		STATUT : <u>APPROUVÉE</u>

Voir fichier « Canevas_plaques_PCR.xlsx » pour une version électronique.

Numéro de la plaque : _____

Date : _____

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

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq	Vérfié par : Marie-Ève Chamberland	Approuvé par : Dr Jeannot Dumaresq	Date d'entrée en vigueur : 19 mars 2020	Page 21 sur 21
----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--	----------------