

	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-007
		VERSION 1.18 2021-10-22
Simplexa COVID-19 Direct		STATUT : <u>APPROUVÉ</u>

Rédigé par :	Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	16 avril 2020
Vérifié par :	Sophie Lalonde, technologiste en microbiologie	16 avril 2020
Approuvé par :		

1. But/Objectif

Le test *Simplexa™ COVID-19 Direct de Diasorin Molecular* est prévu pour fonctionner sur l'appareil *Liaison MDX* (anciennement *Integrated Cycler de 3M*) pour la détection qualitative du virus SARS-CoV-2 (agent de la COVID-19) à partir d'écouvillonnages nasopharyngés chez des patients chez la COVID-19 est suspectée. L'ARN du SARS-CoV-2 est généralement détectable dans les écouvillonnages nasopharyngés durant la phase aiguë de l'infection. Un résultat positif indique la présence d'ARN de SARS-CoV-2. Une corrélation clinique avec l'histoire du patient et d'autres modalités diagnostiques est nécessaire pour déterminer la contagiosité (statut infectieux) du patient. Un résultat positif n'élimine pas une co-infection bactérienne ou une co-infection avec un autre virus. Un résultat négatif n'élimine pas l'existence d'une infection par le virus SARS-CoV-2 et ne doit pas constituer l'unique base pour le traitement ou les autres décisions de prise en charge du patient.

2. Principe et champs d'application

La trousse *Simplexa^{MD} COVID-19 Direct* est une analyse de type RT-PCR (amplification en chaîne par la polymérase, précédée d'une transcription inverse) en temps réel, permettant l'amplification et la détection de l'ARN du virus SARS-CoV-2 directement à partir d'écouvillons nasopharyngés sans extraction préalable des acides nucléiques. Le système comprend la trousse *Simplexa^{MD} COVID-19 Direct*, l'instrument *Integrated Cycler* (cycleur intégré) de 3M (ou *Liaison MDX* de Diasorin molecular), un disque d'amplification directe (« Direct amplification disc ») et des accessoires qui leur sont rattachés.

Des sondes fluorescentes sont utilisées avec des amorces complémentaires pour amplifier l'ARN du virus SARS-CoV-2 et du contrôle interne. Les amorces/sondes ciblent deux régions différentes du génome du SARS-CoV-2 : l'ORF1ab et le gène S. Le gène S encode la glycoprotéine de spicule (*spike*) du SARS-CoV-2. La région ORF1ab encode des protéines non structurales bien conservées et est donc moins susceptible à la recombinaison. Un contrôle interne d'ARN est utilisé pour détecter l'échec ou l'inhibition de la réaction RT-PCR.

3. Documents connexes

- *Simplexa™ COVID-19 Direct* (Réf. MOL4150, Rev. 05)
- Le manuel technique du thermocycleur (*Integrated cycler* de 3M / *Liaison MDX* de Diasorin molecular) (Réf. MOL1001)

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 1 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	---------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

4. Définitions / Abréviations

- PCR: *Polymerase Chain Reaction* (amplification en chaîne par polymérase)
- RT-PCR: PCR précédée d'une transcription inverse (pour convertir l'ARN en ADN)
- ESB : Enceinte de sécurité biologique
- SIL: Système d'information du laboratoire
- SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (agent de la COVID-19)

5. Phase pré-analytique

5.1 Spécimens acceptés

- Écouvillonnages nasopharyngés et écouvillonnages nasaux, prélevés à l'aide d'écouvillons avec un bout synthétique (ex. : Dacron, nylon ou rayonne) et une tige en plastique ou en aluminium. Ne pas utiliser d'écouvillons en alginate de calcium car ils peuvent inhiber la réaction de PCR. Si le tube de milieu de transport est reçu sans écouvillon, ajouter le commentaire « Résultat sous réserve : milieu de transport reçu sans écouvillon ».
- Écouvillons ID NOW invalides sur appareil ID NOW (à suspendre dans 1 ml d'eau moléculaire avant l'analyse)
- Lavage bronchoalvéolaire (peut être dilué 1:1 au besoin dans une solution mucolytique comme le Remel Sputasol par exemple, ou sinon de l'eau moléculaire)
 - Autre option pour les échantillons trop muqueux : lyse mécanique (ex. : SnotBuster de Copan, QIASchredder de Qiagen, ou encore avec une seringue)
- Lavage nasal ou aspiration nasale non dilués
- Gargarisme avec eau de source naturelle Eska ou Naya

5.2 Conservation et transport des échantillons

- Les écouvillons nasopharyngés et nasaux doivent être transportés dans un milieu de transport universel (UTM) ou équivalent, du Remel M5, du Remel M6, du milieu Amies liquide (Copan ESwab™), du Puritan® UniTranz-RT® ou de la saline 0.9%. L'eau moléculaire et le milieu de Hank sont également acceptés (validés dans plusieurs laboratoires au Québec conjointement avec le LSPQ).
 - Ne pas utiliser le milieu Remel M4RT
- **Après le prélèvement, transporter et conserver les tubes de transport entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 7 jours. Si les échantillons doivent être conservés pour une période plus longue, les conserver à une température inférieure ou égale à -80 °C. Les gargarismes peuvent être conservés à température pièce jusqu'à 7 jours. Ces échantillons doivent être conditionnés et étiquetés conformément à la législation régissant le transport d'échantillons cliniques, diagnostiques ou biologiques. Les conditions de conservation (délai et température) doivent être respectées lors du transport.**

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 2 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	---------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

5.3 Critères de rejet

- Les milieux de transport contenant de la guanidine (ex.: Roche media) ne peuvent être analysés car ce milieu requiert une étape d'extraction de l'ARN viral.
- Le milieu M4RT n'est pas compatible avec cette analyse.
- Ne rejeter aucun spécimen, mais s'il s'agit d'un spécimen ou d'une demande inhabituels, veuillez en discuter avec un microbiologiste. Il faut notamment vérifier avec un microbiologiste la compatibilité de tout milieu de transport qui n'est pas listé dans la section 5.2.

5.4 Matériel et réactifs particuliers

- Simplexa™ COVID-19 Direct Reaction Mix (Réf. MOL4151)
 - C'est le mélange réactionnel, qui inclut le contrôle interne.
- Simplexa™ COVID-19 Positive Control Pack (Réf. MOL4160) → Contrôle positif
- Milieu de transport universel inutilisé comme contrôle négatif
 - En absence d'UTM utiliser de la saline 0.9% ou de l'eau grade PCR
- Direct Amplification Disc Kit (Réf. MOL1455)
 - Disque à utiliser sur le thermocycleur
- 3M Integrated Cycler with Integrated Cycler Studio Software version 4.2 or higher (ou LIAISON® MDX Studio Software version 1.1 or higher)
 - Thermocycleur de 3M / Diasorin avec logiciel à jour
- Pipette à volume fixe de 50 µl (**dédiée**)
- Embouts filtrés, stériles et exempts de nucléase pour la pipette

5.5 Conservation et entreposage du matériel

- Conserver les réactifs à une température comprise entre -10 et -30 °C (ne pas utiliser de congélateur à dégivrage).
- Laisser les réactifs décongeler à température ambiante (entre environ 18 et 25 °C) avant utilisation.
- Ne pas utiliser les kits ou les réactifs au-delà de leur date limite d'utilisation.
- Après avoir retiré le mélange réactionnel du congélateur, commencer le test dans les 30 minutes.
- Ne pas mélanger le mélange réactionnel (*master mix*) au vortex.
- Ne pas recongeler le mélange réactionnel (*master mix*).

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 3 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	---------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

6. Phase analytique / instructions techniques

6.1 CONFIGURATION DE L'APPAREIL DE PCR EN TEMPS-RÉEL

6.1.1 Ouvrir l'ordinateur (si pas déjà ouvert)

- login : computer user
- password : integratedcyclor

6.1.2 Allumer les 2 appareils (à l'arrière en bas à droite)

6.1.3 Ouvrir le logiciel (icône disque)

- login : admin
- password : fastman

N.B. Si le logiciel a été ouvert avant l'appareil par erreur, cliquer en haut à gauche de l'écran pour sélectionner « Tool » puis « Find instrum. ».

6.2 CHARGE DU DISQUE D'AMPLIFICATION DIRECTE ET AMPLIFICATION PAR PCR EN TEMPS RÉEL

6.2.1 Sélectionnez les échantillons à tester et les mélanger par vortex.

6.2.2 Décongelez les flacons de mélange réactionnel à température ambiante (entre environ 18 °C et 25 °C). Décongelez un flacon de mélange réactionnel pour chaque échantillon ou contrôle à tester.

6.2.3 Scannez le code-barres du flacon du Simplexa™ COVID-19 Direct Reaction Mix ou la carte à code-barres (petit code-barres en bas à gauche).

*** **Toujours remettre la carte à code-barres dans la boîte de réactifs après chaque utilisation.** ***

6.2.4 Scannez le code-barres du Direct Amplification Disc (DAD).

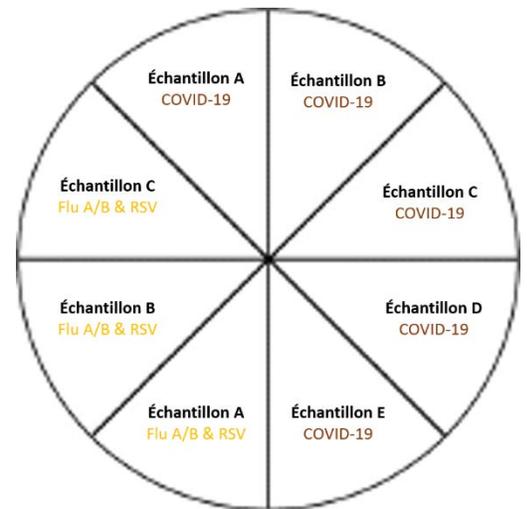
*** **Ne pas réutiliser un DAD contenant un échantillon positif (incluant un contrôle positif) : toujours jeter les DAD contenant un échantillon ou un contrôle positif.** ***

6.2.5 Scannez l'identificateur de chaque échantillon, ou saisissez-le à l'aide du clavier. Il est possible d'analyser des échantillons avec la trousse Simplexa Flu A/B & RSV Direct Gen II ainsi qu'avec la trousse Simplexa COVID-19 sur un même DAD. Il suffit de scanner le code-barres du lot de réactif d'une trousse avant de scanner l'identificateur des échantillons à analyser avec cette trousse. Deux méthodes sont proposées, selon la préférence de l'utilisateur, et il est recommandé de choisir une de ces 2 méthodes et de s'y conformer en tout temps :

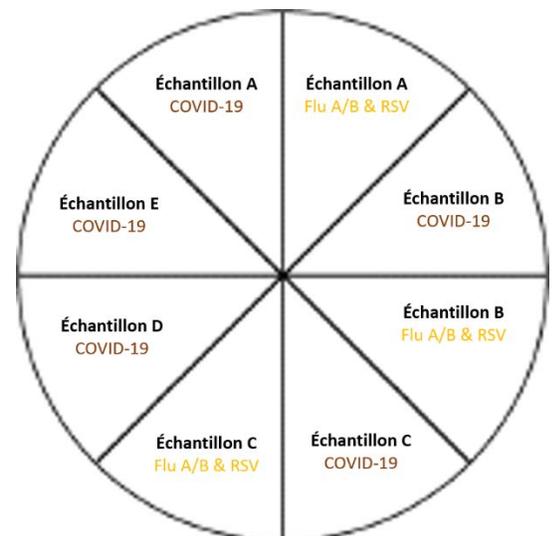
Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 4 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	---------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

Méthode #1 (regrouper les analyses par trousse) : Scanner le code-barres du lot de réactif COVID-19 (toujours débiter par le réactif COVID-19) et scanner ensuite un après l'autre l'identificateur de chaque échantillon à analyser avec la trousse COVID-19. Scanner ensuite le code-barres du lot de réactif Flu A/B & RSV, et scanner ensuite un après l'autre l'identificateur de chaque échantillon à analyser avec la trousse Flu A/B & RSV. Voici un exemple :



Méthode #2 (regrouper les analyses par échantillons) : Scanner le code-barres du lot de réactif COVID-19 (toujours débiter par le réactif COVID-19), et scanner ensuite l'identificateur du 1^{er} échantillon qui doit être analysé à la fois avec la trousse COVID-19 et la trousse Flu A/B & RSV. Ensuite, scanner le code-barres du lot de réactif Flu A/B & RSV, et scanner à nouveau l'identificateur du 1^{er} échantillon qui doit être analysé à la fois avec la trousse COVID-19 et la trousse Flu A/B & RSV. Si des échantillons doivent être analysés seulement avec une des 2 trousse, il faut les mettre à la fin. Voici un exemple :



Peu importe la méthode utilisée, il faut être très prudent lors du pipetage des réactifs et des échantillons sous l'ESB afin d'éviter toute contamination croisée et d'éviter de déposer le mauvais mélange de réactif dans les puits de réactifs. Un échantillon contenant du SARS-CoV-2 peut donner un résultat positif pour influenza A et/ou B s'il est analysé comme un test COVID-19 mais que du réactif Flu A/B & RSV a été pipeté dans le puits de réactif par erreur au lieu du réactif COVID-19. L'inverse est également vrai.

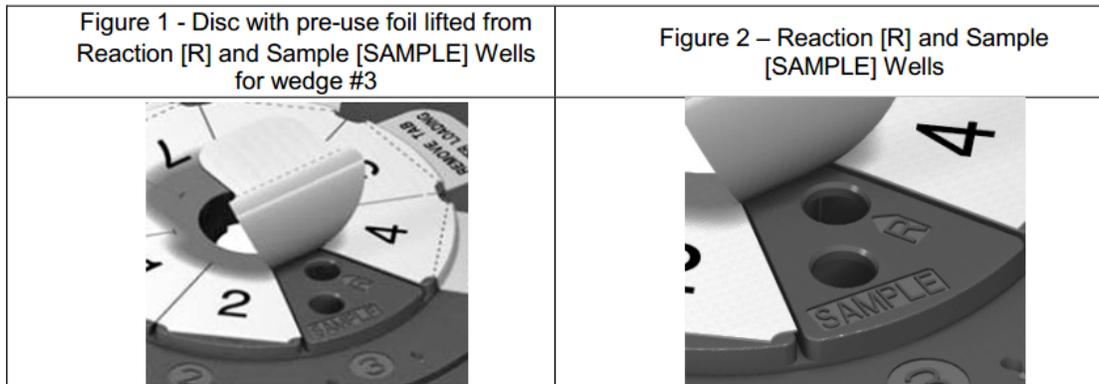
Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 5 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	---------------

<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-007</p>
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

ATTENTION : les étapes 6.2.6 à 6.2.11 se font toutes sous enceinte de sécurité biologique avec jaquette dédiée par-dessus le sarrau et gants recouvrant les poignets. La jaquette doit être utilisée uniquement lors du travail sous ESB et doit être changée à chaque quart de travail.

Toujours décontaminer les surfaces de travail avec ELIMINase^{MD} ou lingette d'eau de Javel 10% suivi d'éthanol 70 % après chaque quart de travail (comptoirs, ESB, clavier d'ordinateur et souris en prenant soin de ne pas faire couler de liquide à l'intérieur du clavier ou de la souris)

- 6.2.6 Un secteur à la fois, détachez partiellement le film adhésif pour exposer les puits de l'échantillon (SAMPLE) et de la réaction (R), sans pour autant retirer entièrement le film adhésif (Figures 1 et 2). Évitez de toucher l'envers du film adhésif qui entrera en contact avec les puits et la surface du disque.

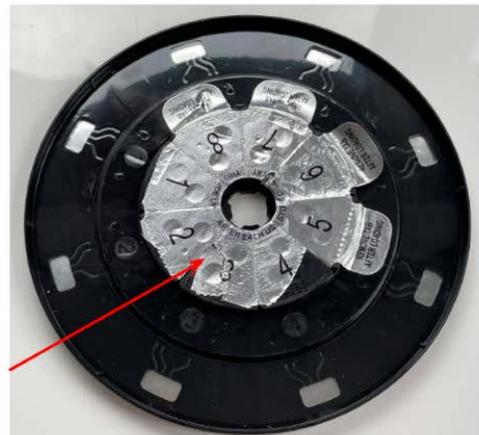


- 6.2.7 Vérifiez que le mélange réactionnel est bien décongelé. Centrifugez les tubes brièvement si nécessaire. Ne pas mélanger le mélange réactionnel par vortex.
- 6.2.8 Utilisez la pipette à volume fixe pour transférer 50 µl du mélange réactionnel dans le puits de réaction (R).
- 6.2.9 Utilisez la pipette à volume fixe pour transférer 50 µl d'échantillon ou de contrôle ; placez l'échantillon ou le contrôle dans le puits d'échantillon (SAMPLE).
- Les écouvillons ID NOW doivent d'abord être suspendus dans 1 ml d'eau moléculaire et mélangés par vortex avant l'analyse.

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

- 6.2.10 Recouvrez le secteur pour sceller les puits à l'aide du film adhésif de laminage détaché plus haut, en appuyant fermement près du bord du secteur. Si le film adhésif d'origine est déchiré, il doit être remplacé avec le film adhésif de remplacement pour les secteurs du disque.
- 6.2.11 Détachez la bandelette du film adhésif de laminage en suivant les perforations.
- 6.2.12 Répétez les étapes 6.3.6 à 6.3.11 pour le(s) échantillon(s) restant(s).
- 6.2.13 Chargez le Direct Amplification Disc scellé dans l'Integrated Cyclor / LIAISON MDX et démarrez la série.
- 6.2.14 Après chaque analyse, vérifiez le disque (DAD) afin de s'assurer qu'il n'a pas été abîmé pendant l'analyse. Un bris du DAD pendant l'analyse pourrait mener à une contamination de l'environnement de travail par des produits d'amplification. Si un DAD abîmé est observé, après l'avoir jeté (voir 6.2.15), procéder immédiatement à une décontamination de l'intérieur de l'appareil (voir section 7.7 Entretien et calibration), et procéder ensuite à des contrôles de surface (voir PON spécifique).

Voici des exemples de DAD abîmés:



- 6.2.15 Après chaque analyse, insérez le DAD dans un sac de plastique étanche et le jeter délicatement dans une poubelle biorisque à l'extérieur de l'ESB utilisée pour pipeter les échantillons, et jeter aussi ses gants.

6.3 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Effectuer un contrôle de la qualité sur chaque appareil une fois par jour à l'aide du Simplexa™ COVID-19 Positive Control Pack (MOL4160) et d'eau moléculaire (ou d'UTM) en guise de contrôle négatif. Un contrôle négatif doit toutefois être effectué à chaque quart de travail dans les laboratoires où il y a un seul appareil. Les plages de contrôle de la qualité ont été établies comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Reportez-vous à la notice de la trousse de Simplexa™ COVID-19 Positive Control (IFUC.US.MOL4160) pour obtenir le mode d'emploi du contrôle positif.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 7 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	---------------

	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-007
		VERSION 1.18 2021-10-22
Simplexa COVID-19 Direct		STATUT : <u>APPROUVÉ</u>

Tester les contrôles positif et négatif lors de la première utilisation de la journée, en alternant d'un appareil à l'autre à chaque jour. Si le contrôle positif ne fonctionne pas, une fois le problème réglé, reprendre l'analyse des échantillons qui ont été testés simultanément avec les premiers contrôles (dans le premier disque du jour).

Si un contrôle négatif sort positif, aviser immédiatement le microbiologiste de garde au laboratoire. Des démarches doivent être entreprises afin d'enrayer un problème potentiel de contamination.

Le contrôle positif est utilisable pour 1 analyse.

Le contrôle négatif peut être utilisé plusieurs fois (conserver au réfrigérateur).

Résultats attendus pour les contrôles

Type de contrôle	Cible ORF1ab	Cible gène S	Contrôle interne ARN
Simplexa™ COVID-19 Positive Control ¹	Positif	Positif	Non applicable ²
Contrôle positif maison	Positif	Positif	Non applicable ³
Contrôle négatif	Négatif	Négatif	Valide

Inscrire les résultats des contrôles positifs (Ct des 2 cibles) dans un logiciel de suivi de la qualité comme Unity Real Time ou QCMD (ou sinon dans le fichier Excel prévu à cet effet) pour permettre le suivi des déviations anormales.

7. Phase post-analytique

7.1 Rapports/résultats

7.1.1 Une fois la série terminée, le logiciel interprète automatiquement les résultats et affiche ceux-ci.

7.1.2 Pour chaque ID d'accession (ID d'échantillon) saisie, le logiciel affiche un résultat :

« Detected » (Déecté), « Not Detected » (Non détecté) ou « Invalid » (Non valide).

1 Les valeurs habituelles de Ct pour un contrôle positif sont comprises entre 22 et 32.

2 La détection du contrôle interne n'est pas requise pour que le résultat soit valide lorsque le contrôle positif est réactif.

3 La détection du contrôle interne n'est pas requise pour que le résultat soit valide lorsque le contrôle positif est réactif.

	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-007
		VERSION 1.18 2021-10-22
Simplexa COVID-19 Direct		STATUT : <u>APPROUVÉ</u>

Interprétation des résultats

Cible SARS-CoV-2		Interprétation
ORF1ab	Gène S	
Positif Ct < 31	Positif Ct < 31	<p>Indique la présence d'ARN de SARS-CoV-2 dans l'échantillon du patient.</p> <p>Résultat à rapporter (message prédéfini @SIP) : Virus SARS-CoV-2 DÉTECTÉ Analyse effectuée avec la trousse Simplexa COVID-19 Maladie à déclaration obligatoire: résultat transmis à la direction régionale de santé publique par le laboratoire.</p> <p>*** Si les 2 Ct sont < 31 ET qu'un écart de 3 Ct est détecté entre les 2 cibles il faut envoyer l'échantillon au LSPQ pour séquençage prioritaire (ex. : S 28 et ORF1ab 24).</p>
Positif Ct ≥ 31	Positif Ct ≥ 31	<p>Lorsque les Ct des 2 cibles sont ≥ 31 ou qu'une seule cible est détectée avec Ct ≥ 31 cela indique habituellement la présence d'une faible quantité d'ARN de SARS-CoV-2 dans l'échantillon du patient.*</p> <p>Résultat à rapporter (message prédéfini @SIF) : Virus SARS-CoV-2 DÉTECTÉ Une faible quantité d'ARN viral a été détectée. S'il s'agit d'une première analyse positive, il est recommandé de soumettre un nouvel échantillon dans les 24-72 heures. Analyse effectuée avec la trousse Simplexa COVID-19 Maladie à déclaration obligatoire: résultat transmis à la direction régionale de santé publique par le laboratoire.</p> <p>*** Si une seule cible est détectée avec Ct < 31 il faut envoyer l'échantillon au LSPQ pour séquençage prioritaire.</p>
Positif Ct ≥ 31	Négatif	
Négatif	Positif Ct ≥ 31	
Négatif	Négatif	<p>Indique l'absence de détection d'ARN de SARS-CoV-2 dans l'échantillon du patient.</p> <p>Résultat à rapporter (message prédéfini @SIN) : Virus SARS-CoV-2 non détecté Analyse effectuée avec la trousse Simplexa COVID-19 Pour les personnes chez qui la probabilité clinique d'une COVID-19 est jugée élevée, il est recommandé de soumettre un nouvel échantillon dans les 24-72 heures.</p>
Invalide (<i>invalid</i>)		<p>Un résultat « Invalid » indique que le logiciel n'a pas pu déterminer de façon concluante l'absence de l'ARN du virus SARS-CoV-2 dans l'échantillon du patient. Ce résultat peut être provoqué par :</p> <p>1) un échec du contrôle interne (ARN-IC); ou 2) un échec de détection d'une quantité suffisante d'échantillon. L'échantillon doit alors être testé à nouveau. Reportez-vous à la section « Résultats non valides » ci-dessous.</p>

* Lorsqu'une seule des deux cibles de SARS-CoV-2 est détectée, le résultat suggère :

- 1) un échantillon avec une concentration d'ARN viral près de ou sous la limite de détection du test (le Ct du gène détecté sera habituellement de 31 ou plus);
- 2) une mutation dans une des régions des cibles (surtout si le Ct du gène détecté est faible → consulter microbiologiste si un seul gène est détecté avec un Ct inférieur à 31 car l'envoi de l'échantillon au LSPQ pour séquençage sera à considérer, et il peut aussi s'agir d'un faux positif lorsque la courbe est non logarithmique);
- 3) ou d'autres facteurs.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 9 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	---------------

	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-007
		VERSION 1.18 2021-10-22
Simplexa COVID-19 Direct		STATUT : <u>APPROUVÉ</u>

Si le contrôle interne n'est pas détecté mais qu'une cible est détectée avec une courbe typique le résultat est valide.

ATTENTION : Veuillez vérifier les courbes d'amplification de tout échantillon positif (cible, contrôle interne et contrôle positif) et montrer à un microbiologiste toute courbe avec un aspect atypique (voir annexes 1 et 2).

7.1.3 Interprétation des codes d'erreur

Résultat	Interprétation et action
EC500	Erreur causée par la qualité des données en raison du bruit de fond, ou d'une amplification trop faible ou tardive du signal. Répéter l'analyse, et si le problème persiste contacter le service technique. Si le contrôle interne est détecté et qu'une des 2 cibles est détectée avec une courbe logarithmique ayant un Ct supérieur ou égal à 31, rapporter « DÉTECTÉ » avec message de faible positif @SIF
EC505	Données insuffisantes pour déterminer si une amplification était présente. Répéter l'analyse, et si le problème persiste contacter le service technique.
EC515	L'amplification du contrôle interne n'est pas l'intervalle attendu (Ct hors norme). Le résultat est invalide en raison d'inhibition partielle de la réaction. Voir section 7.2 pour la suite.

7.2 RÉSULTATS NON VALIDES

Si un code d'erreur d'inhibition est généré pour un échantillon, réanalyser l'échantillon comme suit : centrifuger l'échantillon, le diluer 1:3 (50 µl d'échantillon + 150 µl d'eau PCR) et reprendre l'analyse. Si l'inhibition persiste, analyser avec le m2000 ou le Alinity m (pour les laboratoires associés l'échantillon doit être acheminé au laboratoire de l'Hôtel-Dieu de Lévis en mentionnant que le résultat s'est révélé invalide avec Simplexa).

ATTENTION : pour les écouvillons ID NOW, lorsque le résultat est invalide il faut réanalyser l'échantillon après centrifugation, mais ne pas diluer l'échantillon. Si le résultat demeure invalide à la reprise il faut rapporter le résultat invalide.

Si malgré tout cela l'inhibition persiste, rapporter résultat indéterminé avec message @IND.

7.3 Conservation des échantillons

Conserver les échantillons positifs à -80°C et inscrire le Ct sur le tube

7.4 Intervalles de référence

N/A

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 10 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	----------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

7.5 Valeurs critiques

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.

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.

7.6 Spécification des performances

Pour obtenir une description détaillée des performances du test, se référer à l'encart de la trousse Simplexa™ COVID-19 Direct (Réf. MOL4150, Rev. 05).

7.7 Entretien et calibration

Se référer au manuel technique du thermocycleur intégré (« integrated cyler ») de 3M / LIAISON MDX de Diasorin (Réf. MOL1001).

Nettoyage 1 fois/semaine (le mercredi), à inscrire (date et initiales) dans le fichier Excel prévu à cet effet:

- Intérieur de l'appareil
 - Si de la poussière est présente, la souffler avec un dépoussiéreur pour produits électroniques
 - Première étape : lingettes 10 % eau de javel
 - Deuxième étape : isopropanol 70% (tampons alcool) SAUF disque de plastique transparent (eau distillée)
- Grilles d'aération derrière l'appareil
 - Si de la poussière est présente, la souffler avec un dépoussiéreur pour produits électroniques
- Inspecter le disque de plastique transparent : s'il est craqué veuillez contacter le fabricant afin de le remplacer le plus rapidement possible. Voici un exemple de disque craqué :



Calibration :

- La calibration de l'appareil doit être faite à tous les 6 mois (pour l'instant le fabricant s'en occupe mais il est suggéré de planifier un rappel à tous les 6 mois pour éviter les oublis).

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 11 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	----------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

8. Restrictions et/ou notes spéciales

- 8.1 Utilisez uniquement le protocole décrit dans cette notice. Des écarts par rapport au protocole ou l'utilisation de temps et de températures autres que ceux indiqués pourraient aboutir des résultats erronés.
- 8.2 L'organisation d'un test doit être effectuée à température ambiante (entre 18 °C et 25 °C, environ).
- 8.3 Utilisez des pipettes à volume fixe ou équivalent pour transférer les échantillons et le mélange réactionnel.
- 8.4 Évitez de toucher l'envers du film adhésif qui entrera en contact avec les puits et la surface du disque.
- 8.5 Pour éviter des résultats erronés, assurez-vous que l'échantillon et le réactif sont ajoutés aux puits appropriés.
- 8.6 Terminez de charger les puits d'un secteur et recouvrez celui-ci du film adhésif avant de détacher le film d'un secteur adjacent.
- 8.7 Démarrez la série dans les 30 minutes suivant le retrait du congélateur des flacons de mélange réactionnel.
- 8.8 Ne tentez pas de réutiliser un secteur qui a déjà été utilisé pour une série précédente et ne détachez pas le film adhésif d'un secteur déjà utilisé.
- 8.9 Jeter les disques DAD après chaque utilisation s'ils contenaient un échantillon ou un contrôle positif (ne pas réutiliser ces disques même s'il reste des puits non utilisés). Éliminez les disques utilisés dans un sac de plastique étanche, en les jetant délicatement dans une poubelle biorisque à l'extérieur de l'ESB utilisée pour pipeter les échantillons, et jeter aussi ses gants. et avec précaution : ne pas lancer les disques ou les laisser tomber.
- 8.10 Si l'emballage ou le contenu du kit paraissent brisés ou endommagés, ne l'utilisez pas et contactez le représentant.
- 8.11 Ne pas déplacer le disque de plastique transparent à l'intérieur de l'ESB où les échantillons sont pipetés. Toujours le laisser dans l'appareil sauf lors de sa décontamination.

9. Précautions de sécurité

Veillez vous référer au Manuel de sécurité des laboratoires et au Guide pratique pour les demandes d'analyses de laboratoire en lien avec la COVID-19 du LSPQ.

Portez un équipement individuel de protection comme (mais non limité à) une blouse de laboratoire et des gants recouvrant les poignets lors de la manipulation des réactifs du kit. Lavez-vous soigneusement les mains quand vous avez fini le test.

Traitez tous les échantillons et disques comme potentiellement capables de transmettre des agents infectieux. La contamination des échantillons de patients ou des réactifs peut aboutir à des résultats erronés. Utilisez des bonnes pratiques de laboratoire et contrôlez le flux de travail.

Le mélange réactionnel contient plus de 1 % de glycérol, ce qui pourrait produire des irritations après inhalation ou contact avec la peau. Les mesures de premiers secours doivent être prises en cas d'inhalation ou de contact avec la peau.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 12 sur 18
--	------------------------------------	----------------	---	----------------

	ASSURANCE-QUALITÉ MICROBIOLOGIE Chapitre 1 : Procédures techniques Section : Biologie moléculaire	PON-M-BM-LEV-007
		VERSION 1.18 2021-10-22
Simplexa COVID-19 Direct		STATUT : <u>APPROUVÉ</u>

10. Références

Simplexa™ COVID-19 Direct (Réf. MOL4150, Rev. 05)

Manuel technique du thermocycleur intégré (« integrated cyler ») de 3M / LIAISON MDX de Diasorin (Réf. MOL1001)

Stabilité influenza, entérovirus, HSV et adénovirus 7 jours : J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):1064-5. doi: 10.1128/JCM.06551-11.

Stabilité SARS-CoV-2 7 jours : J Clin Microbiol. 2020 Mar 30. pii: JCM.00590-20. doi: 10.1128/JCM.00590-20.

Document « Mesures_préventives_contamination_PCR - 2021-05-19.docx »

11. Historique des versions

Version	Rédigé par :	Raison de la révision	Entrée en vigueur
01	Jeannot Dumaresq	–	17-04-2020
02	Jeannot Dumaresq	Modifications mineures et ajout des messages à rapportés selon résultat Ajout références stabilité virus 7 jrs	17-04-2020
03	Jeannot Dumaresq	5.2 ajout de l'eau moléculaire et du milieu de Hank comme milieux de transport acceptés 6.4 tester le contrôle positif du fabricant une fois par semaine, mais tester une fois par jour le contrôle positif maison et le contrôle négatif; Inscrire les résultats de contrôles positifs dans Unity Real Time	05-05-2020
04	Jeannot Dumaresq	6.1 Inactivation des virus à 70°C : maintenant 10 minutes au lieu de 15 minutes 7.1 tableau d'interprétation des résultats : un nouveau message de rapport a été créé pour les échantillons dans lesquels un seul gène est détecté Annexe 1 : ajout de plusieurs exemples de courbes non logarithmiques	22-05-2020
05	Jeannot Dumaresq	5.1 : ajout lavage nasal et aspiration nasale conformément à la nouvelle monographie version 0.5 6.1 et encadré précédant les étapes 6.3.6 à 6.3.11 (maintenant 6.2.6 à 6.2.11): retrait de l'étape d'inactivation car les manipulations des échantillons se font toutes sous ESB, et sections 6.2, 6.3 et 6.4 renommées 6.1, 6.2 et 6.3 respectivement 6.3 (maintenant 6.2): retrait de l'encadré mentionnant qu'une extraction préalable n'est pas nécessaire 6.3 (maintenant 6.2): DNase remplacée par ELIMINase car c'est le produit commercial utilisé 7.8 : ajout du dépoussiérage dans l'entretien hebdo	
06	Jeannot Dumaresq	5.3 : milieu M4RT non compatible (rejet), et précision de vérifier avec microbiologiste tout milieu de transport non listé dans la section 5.2	

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 13 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	----------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

		<p>8.10 : Après chaque utilisation, conserver les disques DAD (Direct Amplification Disc) <u>à plat</u> avec le film numéroté sur le dessus.</p> <p>Annexe 2 : précision concernant les exemples de courbes atypiques → les courbes typiques dans les images sont les contrôles internes</p>	
07	Jeannot Dumaresq	7.1 Précisions apportées à l'interprétation des résultats en fonction des Ct obtenus	
08	Jeannot Dumaresq	<p>7.2 : Retrait de l'étape de vérification des courbes des <u>échantillons négatifs</u> (ces courbes sont toujours atypiques, et les amplifications tardives génèrent habituellement une erreur EC500)</p> <p>7.3 : retrait des instructions d'envoi au LSPQ pour confirmation car ce n'est plus requis (instructions disponibles sur la plateforme PHAGE si jamais nous avons une situation très particulière)</p>	
09	Jeannot Dumaresq	<p>7.2 : retrait de l'étape de dilution 1:10, et on analyse sur m2000 à HDL si échec à la reprise sur Simplexa après centrifugation/dilution</p> <p>7.2 : retrait du message JINHI à ajouter lorsqu'on dilue l'échantillon 1:4 et que le résultat est valide</p> <p>7.5 : les appels à la santé publique se font entre 8h30 et 20h00</p>	Juillet 2020
10	Jeannot Dumaresq	<p>7.1 : modification valeur seuil de Ct pour un faible positif de 33 à 31</p> <p>modification des codes de message (codes SoftLab)</p> <p>précision concernant le code d'erreur EC500 : peut être rapporté comme faible positif dans certaines circonstances</p>	23 octobre 2020
11	Jeannot Dumaresq	<p>5.1 : ajout du gargarisme avec eau de source Eska ou Naya dans les échantillons acceptés</p> <p>7.1 : correction du code pour @SIF pour les faibles positifs, et correction du Ct seuil à 31 au lieu de 33 dans la note de bas de tableau</p> <p>7.2 : ajout de l'option du Alinity m pour les échantillons qui demeurent invalides malgré la dilution 1:3</p>	8 décembre 2020
12	Jeannot Dumaresq	6.3 : tester à tous les jours le contrôle positif du fabricant (il n'est plus nécessaire de tester un contrôle positif maison puisque le contrôle du fabricant n'est plus en rupture d'approvisionnement)	15 décembre 2020
13	Jeannot Dumaresq	6.3 : ajout précision → contrôles quotidiens à faire sur <u>chaque appareil</u>	9 février 2021
14	Jeannot Dumaresq	5.1, 6.2.9 et 7.2 : ajout de précisions concernant l'analyse des écouvillons ID NOW invalides sur appareil ID NOW, qu'il faut analyser sur Simplexa lorsque reçus au laboratoire.	8 avril 2021
15	Jeannot Dumaresq	<p>6.2 : encadré sur l'EPI mentionne maintenant de porter une jaquette dédiée lors du travail sous ESB et de changer cette jaquette à chaque quart de travail</p> <p>6.2.4 : ne plus réutiliser les DAD, toujours en utiliser des neufs</p> <p>6.3 : dans les laboratoires où il y a un seul appareil il faut maintenant faire un contrôle négatif à chaque quart de travail (mais on continue à faire un seul contrôle positif par jour par appareil)</p>	21 mai 2021

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 14 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	----------------

<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-007
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Simplexa COVID-19 Direct</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

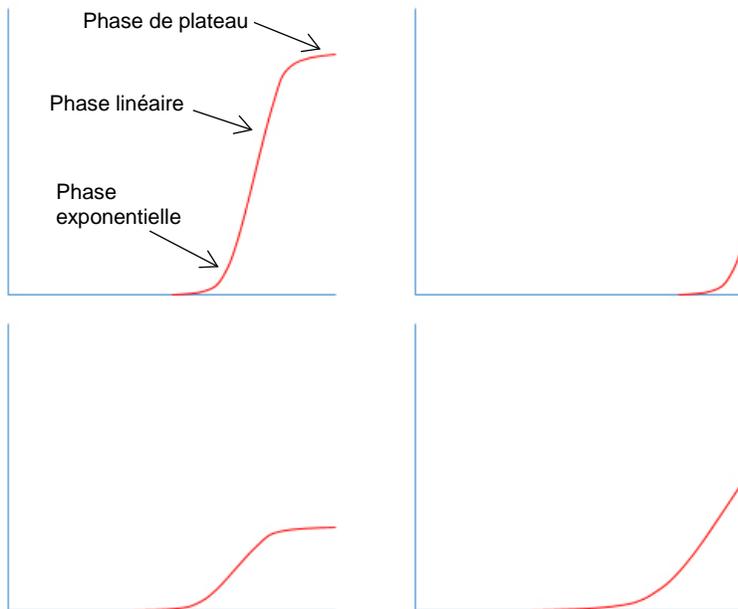
		<p>7.1 : plusieurs modifications apportées au tableau d'interprétation des résultats : ajout de précisions et ajout d'indications analytiques claires justifiant l'envoi au LSPQ pour séquençage prioritaire</p> <p>8.9 : ne plus réutiliser les DAD et en disposer avec précaution après chaque utilisation</p> <p>Références : ajout du document « Mesures_préventives_contamination_PCR - 2021-05-19.docx »</p>	
16	Jeannot Dumaresq	<p>6.2.5 ajout de précisions concernant la possibilité d'analyser les trousseaux Simplexa COVID-19 et Flu A/B & RSV sur le même DAD</p> <p>Encadré juste avant 6.2.6 : précision des zones à décontaminer ainsi que la fréquence (après chaque quart de travail)</p> <p>Ajout étape 6.2.14 : vérifier DAD après chaque analyse</p> <p>Ajout étape 6.2.15 : insérer DAD dans un sac de plastique hermétique, et le jeter (ainsi que les gants) délicatement dans une poubelle à l'extérieur de l'ESB</p> <p>7.7 ajout d'une étape d'inspection du disque de plastique transparent</p> <p>8.11 toujours laisser le disque de plastique transparent dans l'appareil sauf lors de sa décontamination</p>	7 octobre 2021
17	Jeannot Dumaresq	<p>6.2.4 et 8.9 : s'il reste des puits non utilisés, on peut réutiliser les disques DAD dont tous les échantillons étaient négatifs; il faut jeter tout disque DAD contenant un échantillon ou un contrôle positif</p>	18 octobre 2021
18	Jeannot Dumaresq	<p>Annexe 1 : ajout de détails et d'autres exemples concernant l'interprétation des courbes PCR avec exemples de faux positifs</p>	22 octobre 2021

Nom du fichier informatique : SIMPLEXA_COVID-19_DIRECT_PON-M-BM-LEV-007_V1.18

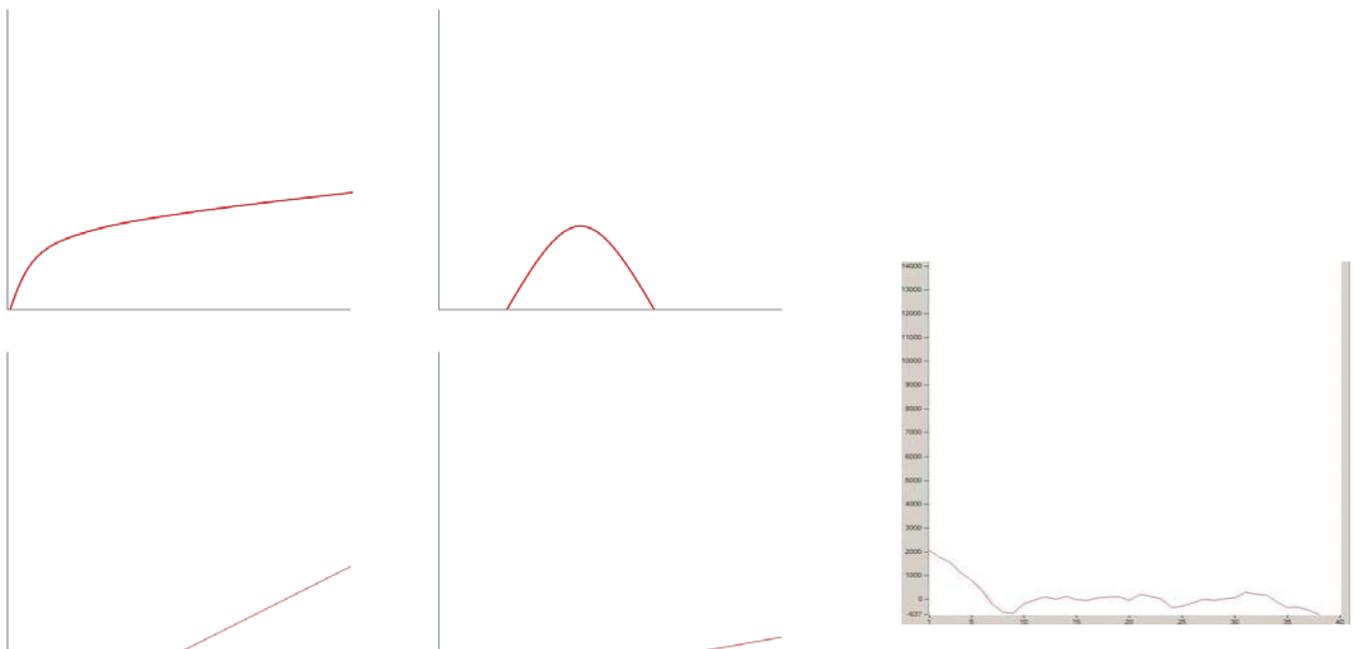
Ce document est approuvé par le Chef de service. La copie électronique de ce document est conservée par la coordonnatrice régionale à la qualité laboratoires et EBMD du CISSS Chaudière-Appalaches.

Rédigé par : Dr Jeannot Dumaresq, microbiologiste-infectiologue	Vérifié par : Sophie Lalonde, T.M.	Approuvé par :	Date d'entrée en vigueur : 17 avril 2020	Page 15 sur 18
---	------------------------------------	----------------	--	----------------

Courbes considérées normales/typiques (courbes logarithmiques)

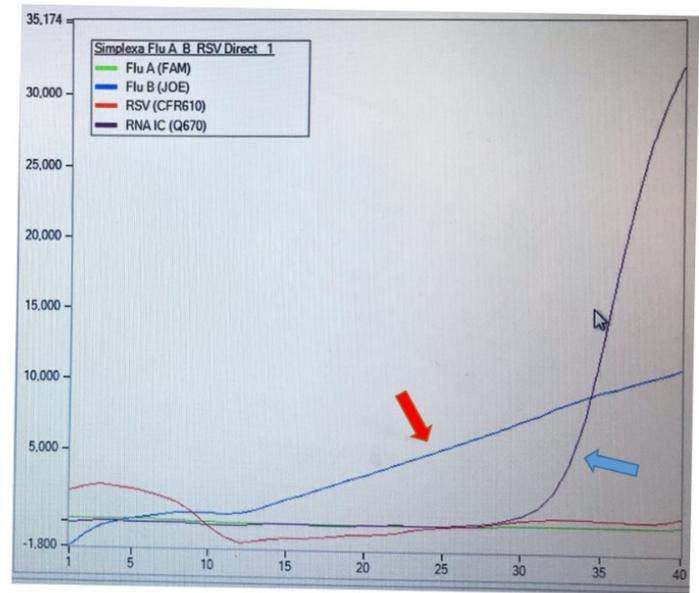
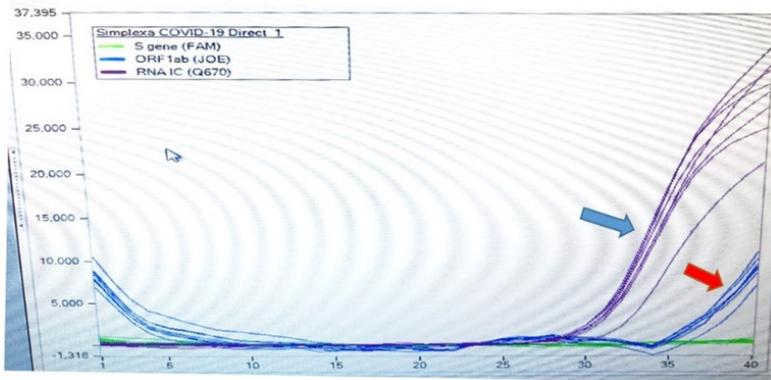
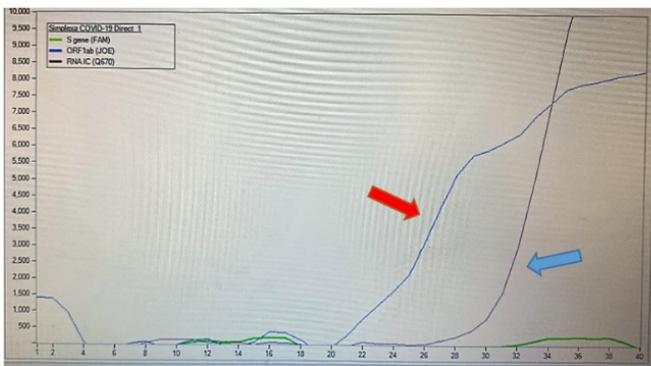


Courbes considérées anormales/atypiques (courbes non logarithmiques)



<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-007</p>
		<p>VERSION 1.18</p> <p>2021-10-22</p>
<p>Annexe 1: Interprétation courbes PCR et exemples de faux positifs</p>		<p>STATUT : <u>APPROUVÉ</u></p>

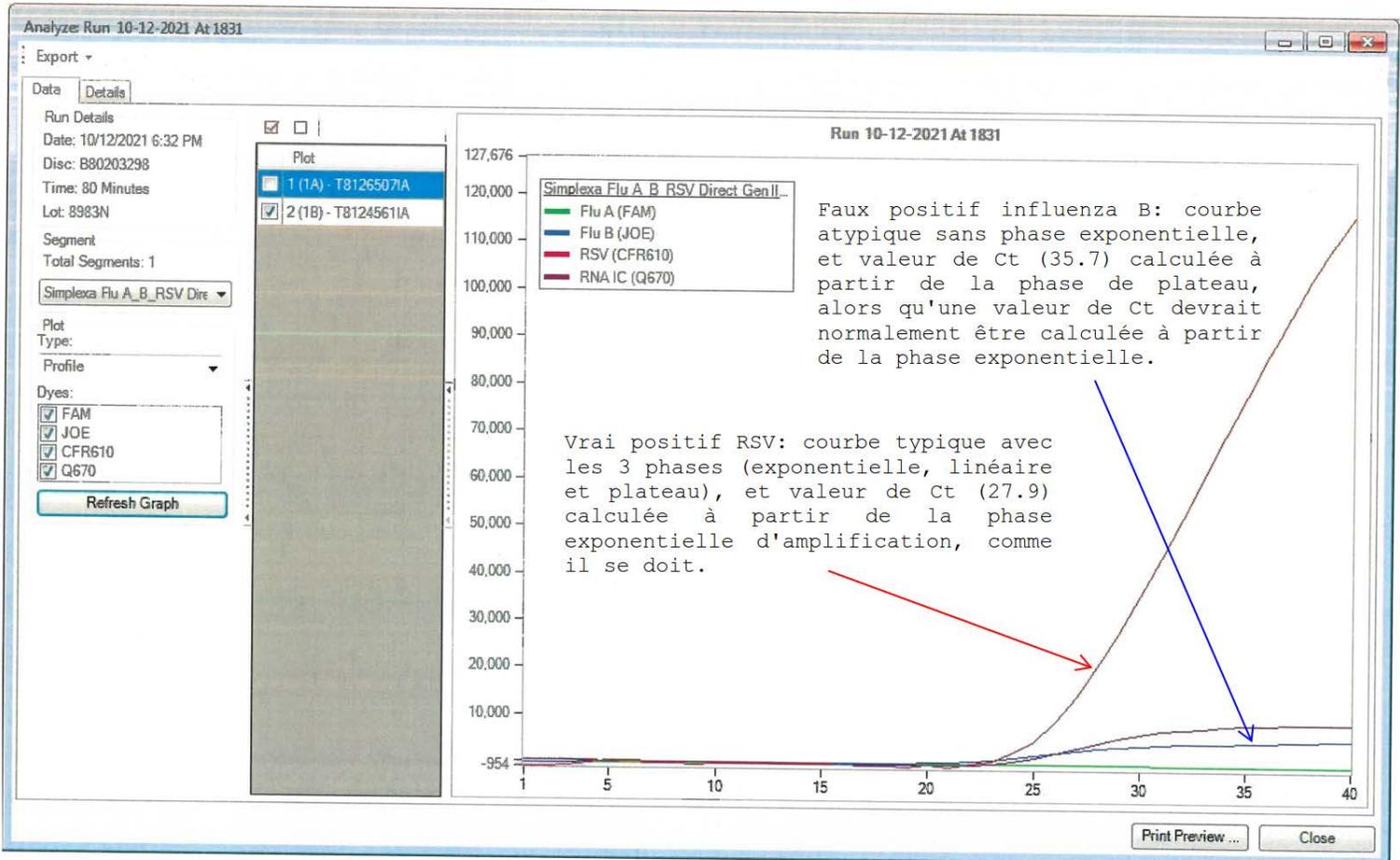
Exemples de faux positifs - Simplexa



- ➡ Courbes typiques (logarithmiques)
- ➡ Courbes non logarithmiques (faux positifs)

(Les courbes logarithmiques/typiques dans ces images représentent les contrôles internes)

Exemples de vrai et de faux positifs



Analyze Run 10-12-2021 At 1831

Export

Data Details

Details

Instrument: 100591
Disc: B80203298 - Direct Amplification Disc
Spectral Matrix:

	FAM	JOE	CFR610	Q670
520	1	0.013	0	0
560	0.035	1	0.001	0.002
610	0.009	0.013	1	0.009
682	0	0	0.005	1

Result Summary

Sample	Sample Type	Fluid Check (520)	Flu A(FAM)	Flu B(JOE)	RSV(CFR610)	RNA IC(Q670)
1 (1A) - T81265071A	Unknown	157.5	0.0	0.0	21.2	0.0
2 (1B) - T81245611A	Unknown	130.9	0.0	35.7	27.9	0.0