

| | | | |
|---|---|-----------------------------|--|
|  | ÉTUDE DE DÉCENTRALISATION TB SPEED | TBS_ID_SOP_SF | |
|  | METHODE PAR FLOTTAISON AU SACCHAROSE POUR LE TRAITEMENT DE SELLES POUR UN TEST ULTRA | Version 1.0 10/02/2020 | |

| | Rédigé par | Revue par | | Validé par |
|--------------------------------|---|----------------------------|--|--------------------------------------|
| Nom | Manon Lounnas | Maryline Bonnet | Eric Wobudeya | Sylvain Godreuil |
| Fonction | Coordinateur de Laboratoire International | Co-investigateur principal | Responsable de l'axe et Co-investigateur principal | Microbiologiste d'essai de référence |
| Date et signature électronique | | | | |

OBJECTIF

Normaliser les tests Xpert MTB / RIF Ultra (Ultra) sur des échantillons de selles fraîches en utilisant la méthode de traitement des selles par flottation de saccharose

CHAMP D'APPLICATION

Cette procédure s'applique à tous les laboratoires de l'HD participant à l'étude de Décentralisation TB Speed

RESPONSABILITÉS

Le coordinateur de laboratoire international (ICL) est responsable de la diffusion de ce SOP auprès des UTC nationales. Les coordinateurs de laboratoire nationaux (NCL) sont responsables de la diffusion de ce SOP vers les sites d'étude. Le laboratoire du site en charge est responsable de l'application de ce SOP.

ICL et NCL sont responsables du suivi de la mise en œuvre correcte de ce SOP dans tous les laboratoires de l'HD participant à l'étude.

Le personnel du laboratoire est responsable du traitement des échantillons de selles en utilisant la méthode optimisée de flottation du saccharose, de l'exécution du test Ultra et de l'enregistrement des résultats du test.

ABRÉVIATIONS

| | |
|-------|---|
| UEC | Unité d'essais cliniques |
| eFRC | formulaire électronique de rapport de cas |
| nCL | Coordinateurs de laboratoire nationaux |
| iCL | Coordinateurs de laboratoire internationaux |
| Ultra | Xpert MTB/Rif Ultra |
| SOP | Standard Operation Procedure |
| TB | Tuberculose |

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|-----------|
| OBJECTIF | 1 |
| CHAMP D'APPLICATION | 1 |
| RESPONSABILITÉS | 1 |
| ABRÉVIATIONS | 1 |
| SÉCURITÉ | 3 |
| ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL | 3 |
| ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES | 3 |
| INSTRUCTIONS GÉNÉRALES | 4 |
| QUAND TRAITER LES ÉCHANTILLONS SELLES ? | 4 |
| STOOL RECEPTION AT LABORATORY | 5 |
| MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLE | 5 |
| MATÉRIELS | 6 |
| PROCÉDURE ÉTAPE PAR ÉTAPE PESANT 0,5 G DE SELLES | 6 |
| PROCÉDURE DE TRAITEMENT DES SELLES | 7 |
| PRÉSENTATION DE LA PROCÉDURE | 7 |
| MATÉRIELS ET ÉQUIPEMENT | 7 |
| PROCÉDURE ÉTAPE PAR ÉTAPE DE TRAITEMENT DES SELLES POUR LES TESTS ULTRA | 8 |
| RENDU DES RÉSULTATS | 9 |
| QUE FAIRE APRÈS TEST? | 9 |
| DOCUMENTS ASSOCIÉS | 9 |
| RÉFÉRENCE | 9 |
| ANNEXES | 10 |
| ANNEXE 1: FORMULAIRE DE SUIVI DES ÉCHANTILLONS | 11 |
| ANNEXE 2: FORMULAIRE DE DEMANDE DE LABORATOIRE | 11 |
| ANNEXE 3: PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE SHEATHER | 12 |
| 1.1.1. <i>Equipement, matériels and réactifs</i> | 12 |
| 1.1.2. <i>Procédure</i> | 12 |
| ANNEXE 4: VIDÉO SUR LA MÉTHODE DE FLOTTATION DU SACCHAROSE | 13 |
| ANNEXE 5: FORMULAIRE DE RÉSULTAT ULTRA..... | 13 |
| ANNEXE 6: REGISTRE DES ÉCHANTILLONS DE TB | 13 |
| ANNEXE 7: INSTRUCTION D'UTILISATION POUR LA MÉTHODE DE FLOTTATION DU SACCHAROSE | 13 |

SÉCURITÉ

Les étapes ci-dessous sont effectuées sous une armoire de biosécurité ou avec un masque chirurgical.



- Traitez tous les échantillons comme du matériel biologique potentiellement infectieux.
- En cas de déversement, nettoyer la zone affectée avec 0,5% d'hypochlorite de sodium (eau de javel).
- Jeter tous les déchets dans une poubelle médicale à risque biologique.

Se référer au Manuel de Sécurité des Laboratoires Nationaux de Santé et de Gestion des Déchets pour d'autres considérations de sécurité.

ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL

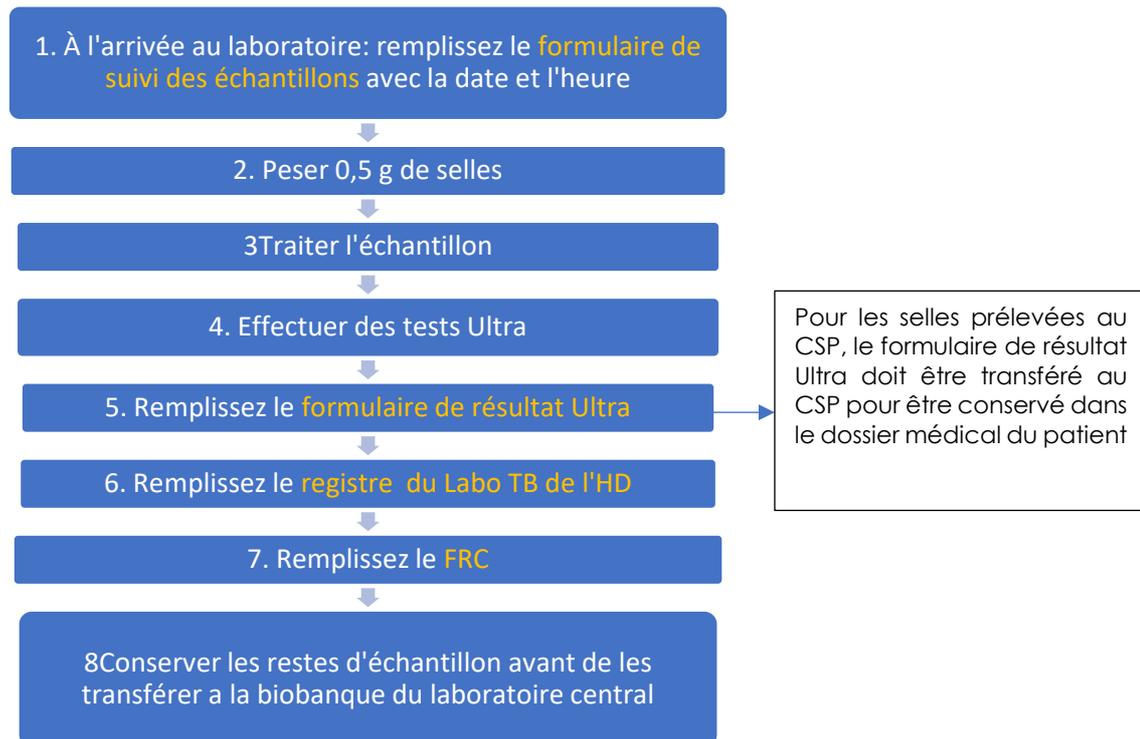
- Armoire de biosécurité classe II
- 0,5% d'hypochlorite de sodium (eau de javel)
- 70% d'alcool (ou d'éthanol ou d'EtOH)
- EPI (équipement de protection individuelle)
- Papier hygiénique ou feuille plastique
- Portoir d'échantillons
- Minuteur
- Marqueur
- Tube conique stérile 50 ml / 15 ml (tube Falcon)
- Pipette 1000 uL ou pipettes Pasteur graduées stériles (2 ml)
- Abaisse-langue
- Balance électronique
- Solution stérile à 50% de Sheather (cf. annexe 1)
- Compresse
- Centrifugeuse pour tubes de 15 ml
- Kit Xpert MTB / RIF Ultra (réactif échantillon, cartouche, pipette de transfert stérile à usage unique)
- Machine GeneXpert

ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

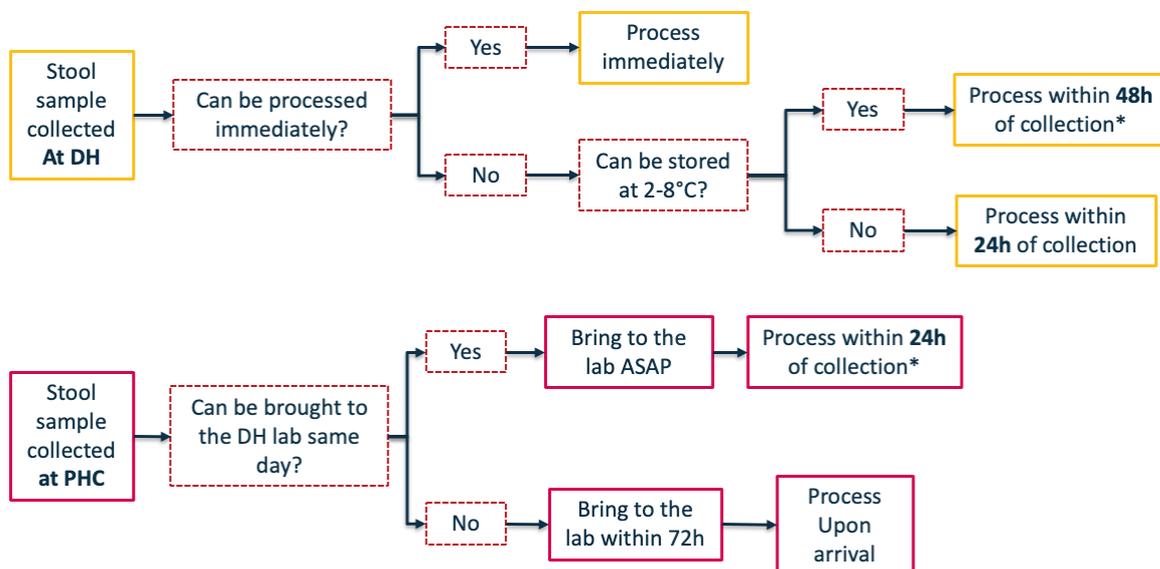
Échantillon de selles fraîches.

Un échantillon de selles fraîches est un échantillon qui n'est pas congelé et sans conservateur supplémentaire.

INSTRUCTIONS GÉNÉRALES

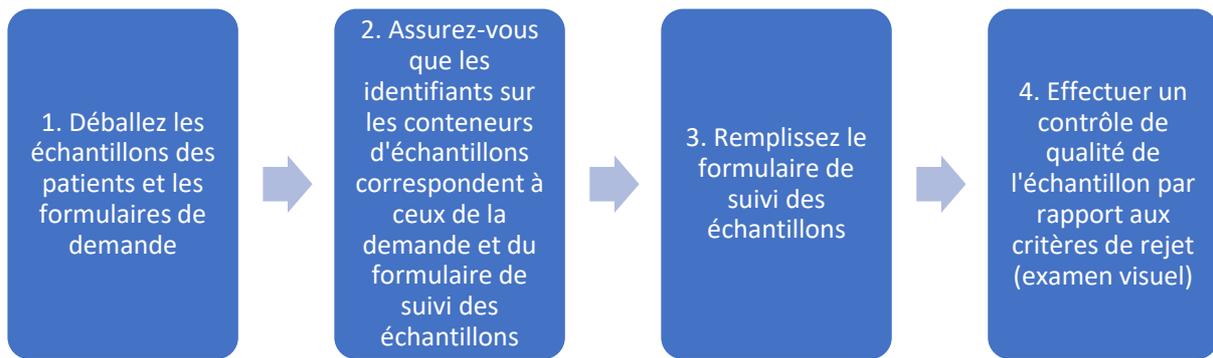


QUAND TRAITER LES ÉCHANTILLONS SELLES ?



*Exceptionally, if stool samples did not meet the time/temperature storage requirements before processing, samples may be processed anyway but details of time/temperature storage documented as a protocol deviation.

STOOL RECEPTION AT LABORATORY



Rejetez l'échantillon si:

1. Le conteneur d'échantillon est cassé, endommagé ou fuit. N'essayez pas de récupérer un tel échantillon car il peut vous exposer à des risques d'infection.

Mettez l'échantillon en quarantaine si:

1. Le récipient d'échantillon n'est pas étiqueté ou il n'y a pas suffisamment d'informations sur le récipient pour correspondre au formulaire de demande de laboratoire.
2. Les informations sur le formulaire de demande de laboratoire ne correspondent pas à l'étiquette de l'échantillon.

Si aucune information supplémentaire n'a pu être obtenue, **rejetez**.

Ne pas rejeter pas l'échantillon mais informer l'investigateur si:

1. Temps de transport et traitement des échantillons retardés
2. La température dans la boîte de transport n'est pas adéquate

Important: En cas de rejet de l'échantillon, un autre échantillon ne sera PAS prélevé pour l'étude d'intervention.

MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLE

- Le transfert des selles du point de prélèvement DH au laboratoire GeneXpert est effectué dans les 24 heures après le prélèvement selon les procédures spécifiques à l'étude (voir **SOP transport des échantillons**).
- Le transfert des selles du CSP au laboratoire GeneXpert est effectué dans les 72 heures après le prélèvement conformément à l'étude et aux procédures spécifiques au site (voir **SOP transport des échantillons**).
- Le technicien de laboratoire recevant les échantillons au niveau du laboratoire doit enregistrer l'heure, le volume et l'aspect des selles dans le «registre des échantillons de TB de l'HD»
- Lors de la réception au laboratoire, l'échantillon de selles doit être traité dès que possible ou sera conservé au réfrigérateur à 4 ° C
- Les selles doivent être traitées dans les 72 h après la collecte
- Avant la manipulation, laissez les selles se réchauffer à la température ambiante pour celles précédemment maintenues à basse température.

Matériels

| Selles solides à glaireuses | | Selles liquides | |
|---|--|--|--|
| Tube Falcon 50 ml + portoir  | abaisse-langue ou oese plastique  | Pots de selles  | Pipette Pasteur  |
| Marqueur  | | Balance electronique (precision 0.1 g)  | |

Procédure étape par étape pesant 0,5 g de selles

1. Homogénéisez l'échantillon de selles à l'aide d'un abaisse-langue ou d'un bâton en bois
2. Étiqueter un tube Falcon de 50 ml ou un pot pour selles (tube n° 1) avec l'identifiant de l'échantillon et l'abréviation de la méthode «SF».
3. Pour les selles solides à glaireuses:
Transférer 0,5 gramme de l'échantillon avec un abaisse-langue dans un **tube Falcon de 50 ml**: peser un récipient vide, tarer la balance et peser 0,5 gramme de selles ($\pm 0,1$)



Pour les selles liquides:

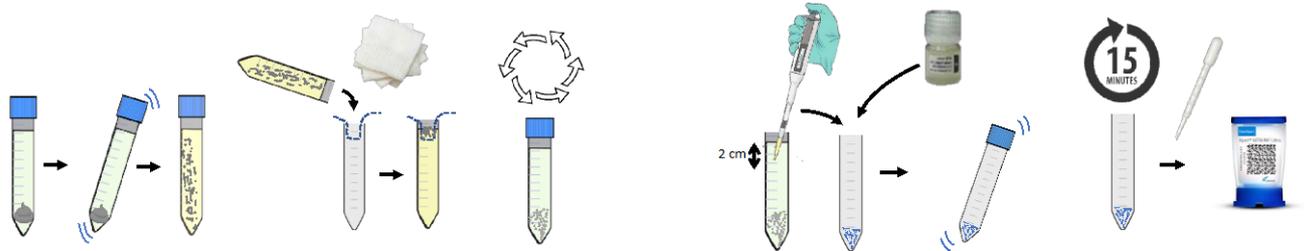
Transférer 0,5 gramme de l'échantillon avec une pipette Pasteur dans le **pot de selles**: peser un récipient vide, tarer la balance et peser 0,5 gramme de selles ($\pm 0,1$)

4. Jeter l'abaisse-langue ou la pipette Pasteur
5. L'échantillon est prêt à être traité pour Ultra

PROCÉDURE DE TRAITEMENT DES SELLES

Présentation de la procédure

- | | | | | |
|---|--|---|--|---|
| 1. Add 0.5 g of stool in 10 ml of 50% Sheather's solution + vortex shaking | 2. Filtration through a gauze into a new 15 ml Falcon tube | 3. Centrifugation at 100xg for 1 minute | 4. Transfer 0.5 mL from the top of the specimen to a 15 ml Falcon tube and Add 1.8 mL of Sample Reagent + vortex shaking | 5. Incubation and transfer to the Xpert Ultra cartridge |
|---|--|---|--|---|



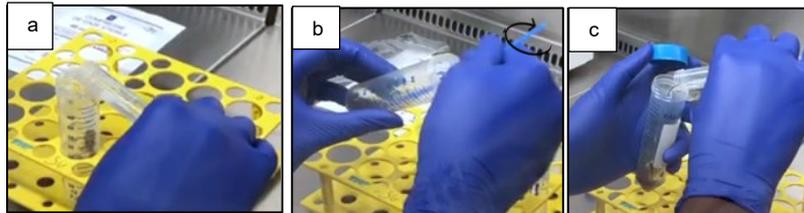
Matériels et équipement

| Équipement | |
|---|---|
| Vortex | Centrifugeuse |
|  |  |

| consommable et petit équipement | | | |
|---|---|--|---|
| 0,5g de selles + portoir | Solution de Sheather (10 ml) (tube n ° 2) | Tube Falcon 15 mL (tube n ° 3) | Compresses stériles |
|  |  |  |  |
| Minuteur | Marqueur | Pipette Pasteur (2 mL) | Réactif d'échantillon + cartouche + pipette (Inclus dans le kit VTT / Rif Ultra) |
|  |  |  |  |

Procédure étape par étape de traitement des selles pour les tests Ultra

1. Mélangez 0,5 g d'échantillon de selles avec 10 ml de solution de Sheather (cf. Annexe 1 pour la préparation de la solution de Sheather):
 - a. ajouter 5 ml de la solution dans le récipient de selles initial ou 50 ml de tube Falcon (tube n° 1)
 - b. mélanger vigoureusement à l'aide d'un bâton en bois ou d'une œuse en plastique
 - c. ajouter les 5 ml restants de la solution de Sheather
 - d. mélanger à nouveau



2. Vortex 30s pour écraser les selles et vérifier visuellement les particules. Si les selles ne sont pas écrasées, vortexer encore 30s
3. Placer plusieurs couches de gaze stérile directement dans le tube de solution de gaine de 15 ml (tube n° 2) et verser lentement la solution de selles sur la compresse stérile.
4. Centrifuger à 100 x g pendant 1 minute (sans frein)
Retirez délicatement le tube de la centrifugeuse sans déranger la suspension
5. Étiqueter un nouveau tube Falcon de 15 ml (tube n° 3) avec l'ID de l'échantillon et ajouter 1,8 ml de réactif échantillon.
6. Récupérez soigneusement 0,5 ml du haut du tube (les 2 premiers cm) et transférez-le dans le faucon de 15 ml contenant l'échantillon de réactif à l'aide d'une pipette Pasteur graduée de 2 ml.

Remarque: Certaines particules peuvent rester sur le dessus du tube et vous pourriez ne pas voir une couche supérieure claire. Pipeter en évitant au maximum les particules solides. Placer la pointe de la pipette juste sous les particules flottantes et aspirer lentement les 0,5 ml de solution de selles. Si des particules sont piégées, pipetez lentement la solution dans la bouteille et pipetez à nouveau immédiatement.

Si vous avez mélangé la solution en pipetant trop rapidement, centrifugez à nouveau la solution.

7. Vissez le capuchon et secouez vigoureusement 20 fois.
8. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante. À un moment donné, entre 5 et 10 minutes d'incubation, agitez à nouveau vigoureusement l'échantillon 20 fois. Les échantillons doivent être liquéfiés.
Si l'échantillon n'est pas liquéfié et qu'il y a encore des parties solides visibles, secouez-le à nouveau et laissez-le encore 10 minutes..

9. À l'aide de la pipette de transfert stérile incluse dans le kit Ultra, aspirer l'**échantillon liquéfié** dans la pipette de transfert jusqu'à ce que le ménisque soit au-dessus de la marque minimale.
10. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Transférez l'échantillon dans le port ouvert de la cartouche Ultra. Distribuer lentement pour minimiser le risque de formation d'aérosols.
11. Fermez le couvercle de la cartouche. Assurez-vous que le couvercle s'enclenche fermement en place.

RENDU DES RÉSULTATS



QUE FAIRE APRÈS TEST?

- The TB samples will be stored at -20°C and transferred to the central biobank laboratory for storage at -80°C

DOCUMENTS ASSOCIÉS

- Formulaire de suivi des échantillons (TBS_1D_STF_RES) - Annexe 1
- Formulaire de demande de laboratoire (TBS_1D_LRF) - Annexe 2
- Formulaire de résultat Xpert Ultra (TBS_1D_U_RES) - Annexe 5
- Registre de référence des échantillons de tuberculose (TBS_1D_SR_REG) - Annexe 6
- SOP pour transport des échantillons (TBS_1D_SOP_STP)
- SOP pour Biobanque (TBS_1D_SOP_BBK)

RÉFÉRENCE

1. Marcy, O. et al. Performance of Xpert MTB/RIF and Alternative Specimen Collection Methods for the Diagnosis of Tuberculosis in HIV-Infected Children. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, 62, 1161–1168.

ANNEXES

Annexe 1: Formulaire de suivi des échantillons

Annexe 2: Formulaire de demande de laboratoire

Annexe 3: Préparation de la solution de Sheather

1.1.1. Equipement, matériels and réactifs

- Eau distillée
- Saccharose (Difco)
- Balance électronique
- Agitateur magnétique chauffant et a barre aimantée
- Bouteille en verre à bouchon à vis, capacité 1000 ml
- Cylindre gradué
- Autoclave
- Tube Falcon 15 ml

| Consommables de traitement des selles et petit équipement | | | |
|---|---|---|---|
| Saccharose (densité de 1.29cm ³) | Eau distillée | Balance électronique (precision 0.1 g) | Agitateur magnétique chauffant et a barre aimantée |
|  |  |  |  |
| Bouteille en verre à bouchon à vis (1000 mL) | Cylindre gradué | Tube Falcon 15 ml (x50) | Autoclave + ruban adhesif |
|  |  |  |  |

1.1.2. Procédure

1. Dissoudre doucement 454 g de saccharose dans 355 ml d'eau distillée à feu doux sur une cuisinière ou un agitateur magnétique chauffant à l'aide d'un aimant en barre.
2. Autoclave la solution 15 min à 110 ° C
3. Aliquoter 10 ml de cette solution dans des tubes Falcon stériles de 15 ml sous un BSC stérile.
4. Conserver l'aliquote à 4 ° C pour éviter la contamination par les moisissures (les tubes peuvent être stockés jusqu'à 1 mois)

Annexe 4: Vidéo sur la méthode de flottation du saccharose

Annexe 5: Formulaire de Résultat Ultra

Annexe 6: Registre des échantillons de TB

Annexe 7: Instruction d'utilisation pour la méthode de flottation du saccharose