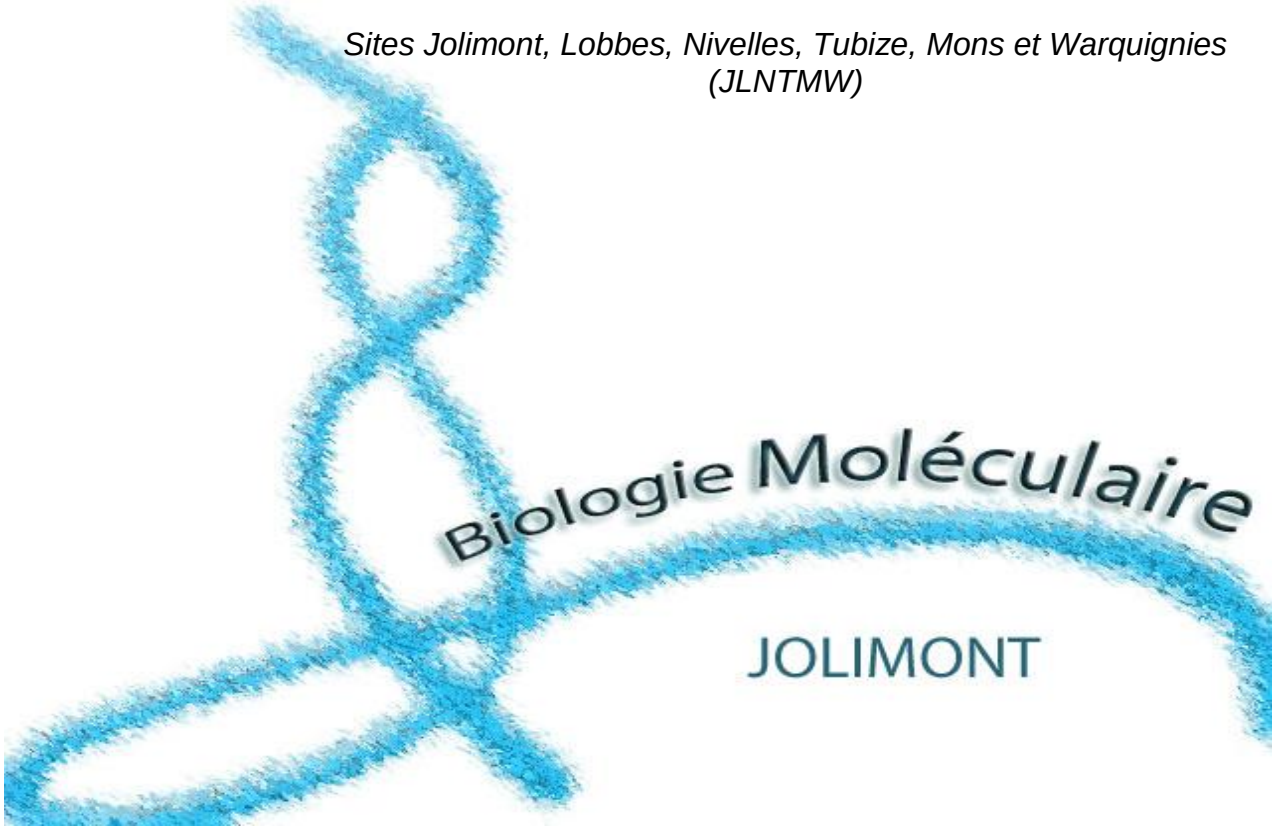
MANUEL PREANALYTIQUE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE CLINIQUE

Sites Jolimont, Lobbes, Nivelles, Tubize, Mons et Warquignies (JLNTMW)



HELORA-BM-MQ009
Version 08

Rédacteur : S.Demartin	Vérificateur : C.Debecker	Approbateur : D. Khuu

Table des matières

Introduction..... 5
Pourquoi un manuel préanalytique en biologie moléculaire ?..... 5
Présentation du manuel 5
Contacts..... 5
Consignes pour les prélèvements en biologie moléculaire 6
Au personnel médical et aux préleveurs… 7
Bon de demande d'analyse en biologie moléculaire 7
Quels sont les paramètres significatifs en préanalytique ? 8
Précautions lors de l'étape de prélèvement..... 8
Précautions après prélèvement 8
Materiel de prélevement general pour PCR 9
❖ Prélèvements sanguins EDTA 9
❖ Pots à urine..... 9
❖ Tubes à PL (LCR) 9
❖ Pots pour les prélèvements respiratoires : LBA, expectorations ……..... 10
❖ Kit de prélèvement « eswab » (milieu Amies) et écouvillon rigide :..... 11
❖ Kit de prélèvement InactivBlue avec écouvillon souple (frottis nasopharyngé, pour recherche de Sars-Cov-2) 11
❖ Kits de prélèvement Copan Frottis avec milieu UTM..... 12
Prélèvements spécifiques a certaines analyses..... 13
❖ Chlamydia Trachomatis, Neisseria Gonorrhoeae, Mycoplasma Genitalium et Trichomonas Vaginalis (CT/NG/MG/TV) : kit de prélèvement « Alinity M multi-collect Specimen Collection Kit » 13
❖ Human Papillomavirus (HPV) : kit de prélèvement «Hologic Preservcyt Thinprep »..... 17
Au personnel du laboratoire…. 19
Aliquotage, conservation et transport des échantillons 19
Autres précautions spécifiques 20

Introduction

POURQUOI UN MANUEL PREANALYTIQUE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ?

Ce manuel est destiné à apporter des informations pratiques aux différents acteurs de la phase préanalytique en vue de garantir la qualité des prestations réalisées par le secteur de biologie moléculaire. Il vous renseigne sur les bonnes pratiques à adopter pour garantir une qualité optimale des résultats rendus, et de ce fait répondre au mieux aux attentes des cliniciens et aux besoins des patients.

Ce manuel est un complément du manuel de prélèvement général. Il convient donc de respecter les consignes du manuel de prélèvement général du laboratoire.

PRESENTATION DU MANUEL

Le manuel de prélèvement décrit les critères importants pour l'obtention d'un résultat diagnostique de qualité. Il donne des instructions précises concernant le prélèvement et la manipulation des échantillons primaires, avant et après arrivée au laboratoire. De ce fait, le manuel est scindé en 2 parties :

- Première partie : s'adresse principalement au personnel médical et aux préleveurs
- Deuxième partie : s'adresse au personnel du laboratoire ainsi qu'aux navetteurs.

CONTACTS

L'équipe de biologie moléculaire reste à votre disposition pour toute question complémentaire. N'hésitez pas à nous contacter :

L'équipe de biologie moléculaire :

Biologiste responsable du secteur : 064 / 23 49 67
Responsables scientifiques : 064 / 23 19 43 ou 064 / 23 17 71

Secrétariat du laboratoire : 064/ 23 40 90

Chef de Service de Biologie Clinique : 064/ 23 49 65

CONSIGNES POUR LES PRELEVEMENTS EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

Le document « Consignes pour les prélèvements en biologie moléculaire » reprend toutes les analyses réalisées en biologie moléculaire au sein du laboratoire du CHU HELORA, Site de Jolimont.

Vous y retrouverez, pour chacune des analyses :

- Les indications INAMI
- Le type de prélèvement sur lequel le test est réalisé
- Les précautions de conservation (avant l'analyse) des échantillons à respecter.

Ce document est également disponible sur l'intranet de l'institution.

Au personnel médical et aux préleveurs…

BON DE DEMANDE D'ANALYSE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

Il existe un bon de demande principal pour les analyses réalisées en biologie moléculaire et un bon de demande spécifique dans le cadre du dépistage du col de l'utérus (« *Bon de demande pour le dépistage du cancer du Col de l'utérus (PCR HPV/ Cytologie* ») .

Ces 2 bons reprennent toutes les analyses de biologie moléculaire réalisées au sein de notre laboratoire, ainsi que toutes les analyses de biologie moléculaire pour lesquelles le remboursement par l'INAMI est soumis à conditions, à savoir une prescription dans des indications bien définies par la nomenclature officielle de biologie clinique.

Remplissez le bon de demande de manière optimale, c'est à dire en complétant **tous** les champs présents sur le bon ET en **cochant l'indication** pour laquelle l'analyse est souhaitée. Ce second point est fondamental pour l'obtention du remboursement du test par l'INAMI.

Lorsque vous souhaitez demander une analyse mentionnée sur ce bon mais dans une autre indication (hors INAMI), veuillez l'indiquer à côté de « autre indication ». Cette analyse sera facturée à charge du patient.

Lorsque vous souhaitez demander une analyse non mentionnée sur ce bon, ou dans une indication non reprise sur ce bon, veuillez mentionner l'analyse souhaitée dans le champ « autre(s) analyse(s) souhaitée(s) ».

L'ensemble des 2 bons de biologie moléculaire est aussi disponible sous forme de prescription électronique dans Xperthis Care.

QUELS SONT LES PARAMETRES SIGNIFICATIFS EN PREANALYTIQUE ?

Vous trouverez les consignes générales pour les prélèvements dans le manuel de prélèvement du laboratoire. Les points ci-dessous sont des précautions spécifiques aux analyses de biologie moléculaire.

Précautions lors de l'étape de prélèvement

- Respectez le matériel de prélèvement recommandé. Référez-vous pour cela à notre document « Consignes pour les prélèvements en biologie moléculaire »

Si l'échantillon est prélevé au moyen d'un matériel inapproprié (tube erroné, kits pour prélèvements génitaux non recommandés…) il ne pourra PAS être utilisé au laboratoire !

- S'il s'agit d'un **prélèvement sanguin** destiné à une analyse en biologie moléculaire, il faut veiller à **ne pas contaminer l'échantillon avec de l'héparine**, inhibiteur de la polymérase (enzyme amplificatrice du matériel génétique).

  Dans le cas où plusieurs tubes de sang doivent être prélevés, il convient donc de respecter un ordre de prélèvement évitant cette contamination des échantillons. **Le prélèvement pour la biologie moléculaire doit toujours être effectué avant le prélèvement d'un tube hépariné.**

- S'il s'agit de **prélèvements urinaires, vaginaux, cervicaux ou urétraux,** les kits de prélèvement à utiliser sont spécifiques des méthodes validées dans notre laboratoire. Les kits recommandés sont renseignés dans le document « *Aliquotage et conservation des prélèvements de Biologie Moléculaire*». Vous trouverez ci-dessous, un descriptif détaillé de la méthode de prélèvement en fonction du kit utilisé.

- Rappelez-vous que tout échantillon doit être considéré comme infectieux. Pour votre propre sécurité, il vous est conseillé de porter des gants. Le port de **gants sans talc** est requis lorsque l'échantillon à prélever est destiné à des analyses de biologie moléculaire car des traces de talc peuvent inhiber les réactions analytiques.

Précautions après prélèvement

- Respectez strictement les **températures** de conservation et le **délai** maximum de transport des échantillons au laboratoire renseignés dans le document « Consignes pour les prélèvement en biologie moléculaire ».

- De mauvaises conditions de températures ou un délai trop long peuvent altérer les composants de l'échantillon qualitativement et/ou quantitativement, engendrant un résultat potentiellement erroné.

MATERIEL DE PRELEVEMENT GENERAL POUR PCR

Le laboratoire met à votre disposition le matériel de prélèvement ci-dessous. Vérifiez toujours la date de péremption du matériel utilisé (tubes de prélèvement sanguin, kit de prélèvement Abbott, …). N'utilisez pas le matériel après la date d'expiration.

❖ Prélèvements sanguins EDTA

Les échantillons sanguins doivent être prélevés dans des **tubes EDTA 10mL** (correspondant par exemple, aux tubes à bouchon mauve des marques BD et Terumo).

❖ Pots à urine

Pot droit de 180 mL PP TP50 à couvercle bleu (JLNT) ou rouge (MW) à visser.

Tubes BD Vacutainer pour les prélèvements urinaires.

❖ Tubes à PL (LCR)

✧ Tube de 15 mL, 120 mm/ Ø17 mm en polypropylène à bouchon rouge (JLNT) ou blanc (MW) conique à plat gradué, stérile et apyrogène

❖ Pots pour les prélèvements respiratoires : LBA, expectorations …

Pot droit de 180 mL PP TP50 à couvercle bleu à visser.

Pot droit de 200 mL PP à couvercle blanc à visser.

❖ **<u>Kit de prélèvement « eswab » (milieu Amies) et écouvillon rigide :</u>**

(disponible à l'économat central sous la référence : « frottis gorge nr. A145267 »)

- Le milieu Amies des tubes eSwabs :
  - Convient pour :
    - PCR : exemple, pour la détection par PCR du virus Influenza (grippe), HSV, Coqueluche … (pour le Sars-Cov-2, opter pour les tubes inactivants, voir ci-après)
    - Recherche d'antigènes
    - Culture bactérienne
  - Ne convient pas pour une culture virale (exemple : Herpès simplex)

- Alternatives en cas d'indisponibilité :
  - Kit Copan UTM avec FloqSwab rigide (voir ci-dessous)
  - Kit Copan UTM avec FloqSwab flexible (voir ci-dessous)

❖ **<u>Kit de prélèvement InactivBlue avec écouvillon souple (frottis nasopharyngé, pour recherche de Sars-Cov-2, Influenza A, Influenza B et RSV)</u>**

- Ces tubes contiennent un liquide inactivant (InactivBlue®) et sont réservés à la recherche de Sars-CoV-2 (ou la recherche multiplex de pathogènes respiratoires, incluant le Sars-CoV-2).

- Le liquide InactivBlue® :
  - Convient pour :
    - La biologie moléculaire (PCR)
  - Ne convient pas pour :
    - Recherche d'antigène
    - Culture bactérienne
    - Culture virale

❖ Kits de prélèvement Copan Frottis avec milieu UTM

- *Le milieu UTM convient pour :*
  - La biologie moléculaire (PCR)
  - La recherche d'antigènes
  - La culture bactérienne
  - La culture virologique
- Ces kits sont réservés aux situations où une culture virale est souhaitée, ou en cas de rupture de stock des prélèvements eSwab, InactivBlue ou Abbott
- Non disponible à l'économat central. Fourni sur demande par le laboratoire.

➢ Copan UTM + écouvillon rigide (pour frottis/grattage de vésicules, région ophtalmique, …)

En fonction des disponibilités, ils peuvent être fournis :

- en kit complet : Copan UTM Regular Floqswab (réf. M10231/359C/1ml)

- séparément : tube Copan UTM (réf. 350C/1ml) et écouvillon rigide (réf. 533CS01)

➢ Copan UTM + écouvillon souple (pour frottis nasopharyngé)

« Copan UTM Flexible MinitipFloqswab » (réf M10233/360C/1ml ou M10230/305C/3ml)

PRELEVEMENTS SPECIFIQUES A CERTAINES ANALYSES

❖ Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium et Trichomonas vaginalis (CT/NG/MG/TV) : kit de prélèvement « Alinity M multi-collect Specimen Collection Kit »

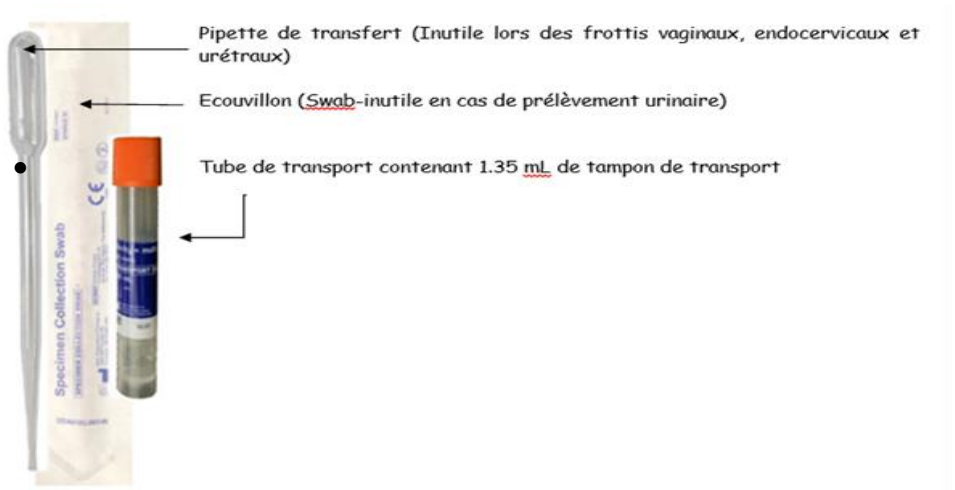
Le kit se conserve entre 15-30°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte. Les prélèvements peuvent se faire chez les hommes et les femmes.

- *Types de prélèvements réalisables*

  - Femmes : écouvillons endocervicaux, vaginaux et prélèvements urinaires.
  - Hommes : écouvillons urétraux et prélèvements urinaires.

- *Composants du kit :*

  - Le kit contient :
    - une pipette de transfert
    - un tube de transport (avec bouchon orange) qui contient 1.2 mL de tampon de transport des échantillons permettant de stabiliser l'ADN jusqu'à la préparation.
    - un écouvillon de prélèvement stérile emballé séparément.



- *Instructions pour le prélèvement*

Veuillez suivre les instructions de l'insert de kit, reprises ci-dessous. Le respect de toutes les consignes de prélèvement est **primordial** au bon déroulement du test et à l'obtention d'un résultat diagnostique correct.

- *Pour les prélèvements urinaires :*

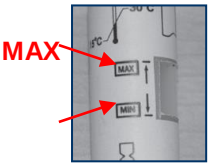
1. Le patient ne doit pas avoir uriné dans l'heure précédant le prélèvement de l'échantillon urinaire.

2. Jeter écouvillon de prélèvement, il n'est pas nécessaire pour ce prélèvement.

3. Le patient doit recueillir les **premiers** 20 à 30 mL de l'urine (la première partie du jet) dans un récipient de collecte d'échantillons d'urine (non fourni dans le kit).

4. Dévissez le bouchon du tube de transport, en prenant soin de ne pas y renverser du tampon de transport.

5. Manipulez le capuchon et le tube avec précaution pour éviter la contamination à l'intérieur et à l'extérieur du tube de transport et du capuchon.
Si nécessaire changez de gants.



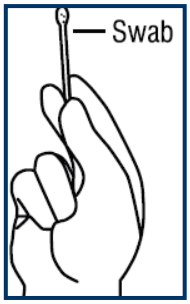
6. Utilisez la pipette en plastique **pour transférer l'urine** du pot de collecte dans le tube de transport. Remplissez jusqu'à ce que le niveau de liquide soit visible dans la fenêtre de remplissage de l'étiquette du tube de transport : **le niveau d'urine DOIT se situer entre les limites MAX-MIN**. Ne remplissez pas de trop.
CETTE ETAPE EST A REALISER PAR LE PRELEVEUR.

7. Ecrivez sur une étiquette adhésive, collée au tube de transport, les informations d'identification de l'échantillon, y compris la date de collection. Prenez soin de ne pas occulter la fenêtre de remplissage sur le tube de transport.

8. Décontaminez et éliminez tous les échantillons, réactifs et autres matériaux potentiellement contaminés conformément aux réglementations locales, étatiques et fédérales en vigueur.

- *Pour les prélèvements Vaginaux / Endocervicaux par écouvillon :*

ATTENTION : N'exposez PAS l'écouvillon au tampon de transport AVANT le prélèvement.

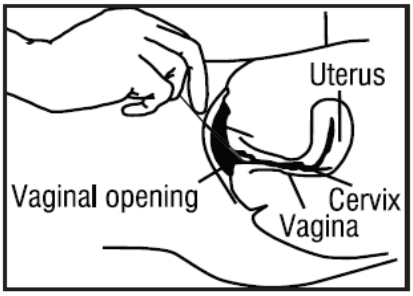


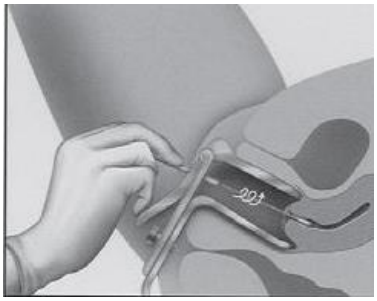
1. Jetez la pipette de transfert, elle n'est pas nécessaire pour ce prélèvement.

2. Retirez l'écouvillon stérile de son emballage. Prenez garde à ce que la pointe de l'écouvillon ne touche rien.

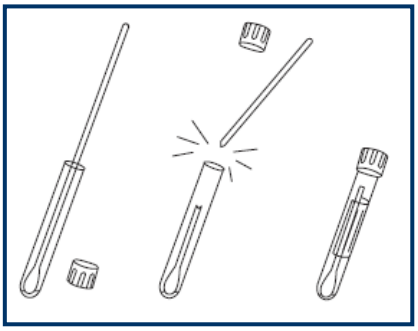
3. Insérez l'extrémité blanche de l'écouvillon de prélèvement d'environ 5 cm (2 pouces) dans l'ouverture du vagin ou dans le canal endocervical.

4. Tournez doucement l'écouvillon pendant 15 à 30 secondes contre les parois du vagin ou contre les parois du canal endocervical.





5. Retirez délicatement l'écouvillon.



6. Manipulez le capuchon et le tube avec précaution pour éviter la contamination à l'intérieur et à l'extérieur du tube de transport et du capuchon. Si nécessaire changez de gants.

7. Dévissez le bouchon du tube de transport et placez immédiatement l'écouvillon de prélèvement dans le tube de transport de sorte à ce que la pointe blanche soit vers le bas.

8. Brisez soigneusement la tige au niveau de la ligne marquée sur le « manche ». Procédez avec précautions afin d'éviter les éclaboussures.

9. Rebouchez le tube de transport. Assurez-vous que le bouchon soit fermé hermétiquement.

10. Identifiez l'échantillon avec une étiquette adhésive, collée au tube, sur laquelle sont écrites les informations d'identification de l'échantillon, y compris la date de collection.

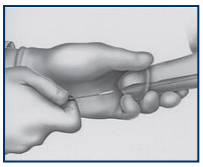
- *Pour le prélèvement urétral chez l'homme :*

ATTENTION : N'exposez PAS l'écouvillon au tampon de transport AVANT le prélèvement.

1. Le patient ne doit pas avoir uriné dans l'heure précédant le prélèvement.

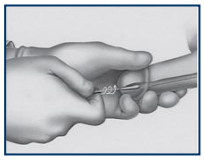
2. Jeter la pipette de transfert, elle n'est pas nécessaire pour ce prélèvement.

3. Retirez l'écouvillon stérile de son emballage. Prenez garde à ce que la pointe de l'écouvillon ne touche rien.

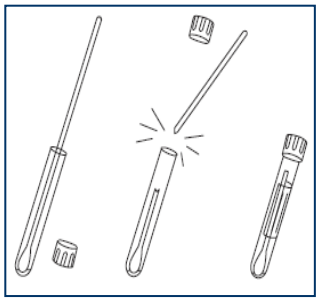


4. Insérez l'extrémité blanche de l'écouvillon de 2 à 4 cm dans l'urètre.

5. Faire tourner doucement l'écouvillon pendant 2 à 3 secondes pour assurer un échantillonnage adéquat.



6. Retirer délicatement l'écouvillon.



7. Manipulez le capuchon et le tube avec précaution pour éviter la contamination à l'intérieur et à l'extérieur du tube de transport et du capuchon. Si nécessaire changez de gants.

8. Dévissez le bouchon du tube de transport et placez immédiatement l'écouvillon de prélèvement dans le tube de transport de sorte que la pointe blanche soit vers le bas.

9. Briser soigneusement la tige au niveau de la ligne marquée sur le « manche ». Procédez avec précautions afin d'éviter les éclaboussures.

10. Rebouchez le tube de transport. Assurez-vous que le bouchon soit bien fermé.

11. Identifiez l'échantillon avec une étiquette adhésive, collée au tube, sur laquelle sont écrites les informations d'identification de l'échantillon, y compris la date de collection.

❖ **<u>Human Papillomavirus (HPV) : kit de prélèvement « Hologic Preservcyt Thinprep»</u>**

- *<u>Hologic Thinprep Pap Vial et Rovers Cervex-Brush :</u>*
  - Conservation à température ambiante (15-30°C)
  - Convient pour le prélèvement, la cytologie ET la recherche d'HR-HPV

- *<u>Composants :</u>*
  - Le pot Hologic Preservcyt Thinprep contient une solution de conservation à base de méthanol (35%-55%) servant de milieu de transport, de conservation et antibactérien pour les échantillons gynécologiques.
  - Ecouvillon pour cellules cervicales, non-stérile, à usage unique.

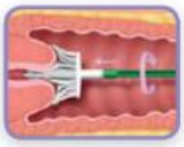
- *<u>Instructions pour le prélèvement :</u>*

ThinPrep® Pap Test
Instructions de prélèvement de l'échantillon

Protocole de prélèvement avec la brosse Cervex-Brush® dans le cadre du ThinPrep Pap Test

- Préparer l'ensemble de l'équipement avant de débuter la procédure.
- Vérifier la date de péremption sur le flacon de prélèvement d'échantillon. Ne pas utiliser de flacons dont la date limite d'utilisation est dépassée.
- Veiller à retirer intégralement le sceau en plastique du bouchon du flacon et à l'éliminer.
- Inscrire les données de la patiente sur le formulaire de demande et sur le flacon. Les échantillons risquent d'être renvoyés s'il manque des données sur le flacon.
- Retirer le bouchon du flacon avant de prélever l'échantillon.
- S'il est nécessaire de lubrifier le spéculum, un peu d'eau tiède peut être utilisée. En cas de nécessité, une petite quantité de lubrifiant hydrosoluble sans carbomère peut être appliquée avec parcimonie sur la partie externe du spéculum, en prenant soin d'éviter l'extrémité, afin de ne pas interférer avec la procédure du ThinPrep Pap Test.

Noter l'identifiant de la patiente sur le flacon en accord avec les réglementations locales. Les données de la patiente et ses antécédents médicaux doivent apparaître sur le formulaire de demande d'examen cytologique.



Obtenir un échantillon adéquat du col de l'utérus à l'aide de la brosse Cervex-Brush (dispositif de type balai). En cas de besoin, utiliser de l'eau tiède pour réchauffer et lubrifier le spéculum. Appliquer parcimonieusement un gel lubrifiant hydrosoluble sans carbomère sur la lame postérieure du spéculum si nécessaire[iv]. Insérer les poils situés au centre de la brosse dans le canal endocervical suffisamment profondément pour que les poils les plus courts soient totalement en contact avec l'exocol. Pousser délicatement la brosse puis la tourner 5 fois à 360° dans le sens des aiguilles d'une montre.

Rincer la brosse Rovers® Cervex-Brush en l'introduisant **<u>immédiatement</u>** dans le flacon de solution PreservCyt® et en la pressant 10 fois au fond du flacon de façon à séparer les poils. En dernier lieu, secouer **<u>vigoureusement</u>** la brosse pour libérer le matériel résiduel. Inspecter visuellement le dispositif Rovers Cervex-Brush pour vérifier qu'aucune matière n'est restée collée. Jeter le dispositif de prélèvement. **Ne pas laisser la tête de la brosse Rovers Cervex-Brush dans le flacon.**

Visser le bouchon de sorte que son repère noir de vissage dépasse le repère noir du flacon. **Ne pas serrer trop fort.**

Placer le flacon et la demande d'examen dans un sachet à échantillon pour le transport jusqu'au laboratoire.

- *Précautions particulières :*
  - Les écouvillons n'ayant pas d'emballage individuel, prendre chaque écouvillon dans le sachet au moyen de gants propres
  - Ne pas utiliser quand l'emballage est détérioré.

- *Contre-indications :*
  - Ne pas utiliser après les 10 premières semaines de grossesse.

Au personnel du laboratoire….

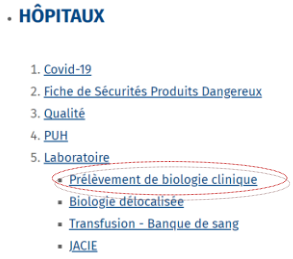
ALIQUOTAGE, CONSERVATION ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Le respect strict des bonnes conditions de manipulation, de température et de délai en ce qui concerne l'aliquotage, la conservation et le transport des échantillons est essentiel. En effet, si ces conditions ne sont pas respectées, l'échantillon peut se dégrader, ce qui empêcherait l'obtention d'un bon résultat analytique (résultat faussement négatif).

Dans tous les cas, le transport de l'échantillon du lieu de prélèvement au laboratoire d'un des 4 sites doit se faire le plus vite possible.

Veuillez-vous reporter au document « *Aliquotage et conservation des prélèvements de Biologie Moléculaire*» qui apporte des précisions importantes, complémentaires à ce Manuel préanalytique en biologie moléculaire. Il est disponible :

- Pour les prescripteurs et préleveurs internes : sur l'intranet



- Pour les prescripteurs et préleveurs externes : sur le site internet : https://www.helora.be/hopitaux/services-medicaux/laboratoire-biologie-clinique

- Pour le personnel de laboratoire : dans Kalilab

  - Aliquotage et conservation des prélèvements de Biologie Moléculaire
  - Manuel de prélèvement en biologie moléculaire
  - Procédure de transport

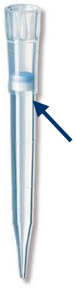
AUTRES PRECAUTIONS SPECIFIQUES

Les analyses réalisées en biologie moléculaire visent, pour la plupart, à déceler la présence de pathogènes dans l'échantillon biologique via la détection de son matériel génétique (ADN ou ARN). Au plus le test sera sensible, au plus il sera efficace. Ces analyses sont donc **extrêmement sensibles**.

Par conséquent, les risques de **contamination** des échantillons sont importants et une contamination même négligeable **conduirait immanquablement** à un résultat diagnostique erroné (résultat faussement positif). Une attention doit donc être apportée aux manipulations des prélèvements destinés aux analyses de biologie moléculaire afin d'éviter les contaminations des échantillons, mais aussi de la surface de travail et du matériel.

De plus, l'ADN ou l'ARN recherché dans le test sont des molécules très sensibles au milieu environnant. Des **précautions particulières** doivent donc être prises :

- Utilisez du matériel à **usage unique** pour ne pas contaminer les échantillons.
- Le port de **gants sans talc** est vivement conseillé, spécialement à partir de l'étape de centrifugation et pour l'aliquotage.
- Changez de gants régulièrement et systématiquement s'ils sont souillés.
- Lors de l'utilisation de micropipettes, utilisez des embouts (tips) à **filtres**, ne les utilisez qu'une seule fois.
- Les embouts doivent être assez longs pour empêcher la contamination du corps de la pipette.



- Ne jamais utiliser un tube ayant déjà été utilisé pour une autre analyse qu'une analyse de biologie moléculaire.