

Procédures opérationnelles standardisées pour l'essai LAKANA

## **POS Proc-04 : Préparation des sacs de prélèvement pour la collecte d'échantillons par écouvillons rectaux et nasopharyngés**

Version 2.0 (2021-04-20)

### **1. Objectif et aperçu :**

Cette procédure opérationnelle standardisée (POS <sup>1</sup>) décrit comment assembler un lot d'échantillons pour le prélèvement d'écouvillons rectaux et nasopharyngés dans le cadre de la sous-étude sur la résistance aux antimicrobiens (RAM) de l'essai LAKANA.

### **2. Applicabilité et responsabilités des différents membres du personnel**

<b>Membre du personnel</b>	<b>Responsabilité</b>
Technicien de laboratoire/scientifique	<ul style="list-style-type: none"><li>- Maintenir un nombre suffisant de matériaux et de réactifs</li><li>- Préparer les réactifs</li><li>- Préparer les lots d'échantillonnage</li><li>- Faire le suivi des dates de péremption</li><li>- Envoyer les lots d'échantillons à l'équipe de collecte des échantillons.</li></ul>

### **3. Matériel nécessaire**

<b>Article</b>	<b>Numéro</b>	<b>Caractéristiques</b>
Écouvillon floqué	4 écouvillons/lot d'échantillons	Pour le prélèvement d'échantillons rectaux, 3 écouvillons (écouvillon Copan avec point de rupture de 30 mm - 520CS01) et pour le prélèvement d'échantillons nasopharyngés, un NPS (écouvillon Copan avec point de rupture de 100 mm - 503CS01).
Sac supplémentaire d'écouvillons floqués	2 sacs/village	Sacs supplémentaires d'écouvillons - un sac d'écouvillons 520CS01 (20 pcs) pour le prélèvement d'échantillons rectaux, un sac d'écouvillons 503CS01 (20 pcs) pour le prélèvement d'échantillons nasopharyngés.

<sup>1</sup> Abréviations : RAM = résistance antimicrobienne, CB = Cary Blair, CSCCom = Centre de Santé Communautaire, DESS = DMSO/EDTA/chlorure de sodium saturé, LAKANA = évaluation à grande échelle des principales activités de promotion de la santé de deux nouveaux régimes d'administration massive de médicaments à base d'azithromycine, NP = Nasopharyngé, POS = procédure opérationnelle standardisée, STGG = milieu contenant du lait écrémé, de la tryptone, du glucose et de la glycérine

<b>Article</b>	<b>Numéro</b>	<b>Caractéristiques</b>
Tube à bouchon à vis de 2 mL avec joint torique	4 tubes/lot d'échantillons	Tubes à bouchon à vis 2 mL tels que Sarstedt (72.694.406)
Milieu STGG	1 mL/lot d'échantillons	Le milieu STGG peut être fabriqué localement, Standardisé, voir annexe 1
Milieu Cary Blair	1 mL/lot d'échantillons	Le milieu Cary Blair peut être fabriqué localement, voir l'annexe 2.
Gants jetables	Modifier selon les besoins	Aucune
DESS moyen	1 mL/lot d'échantillons	DMSO/EDTA/chlorure de sodium saturé, voir annexe 3
Micropipette	1	Pour distribuer 1 mL de milieu
Embouts	3 au moins, 1 pour STGG, 1 pour les milieux Cary Blair et 1 pour DESS. Modifier selon les besoins	1000 µL
Étiquette de l'échantillon	4/lot d'échantillons	Aucune
Sacs d'échantillons	3/lot d'échantillons	Aucune
Désinfectant	500 - 1000 mL	Eau de Javel à 10% et éthanol à 70%.

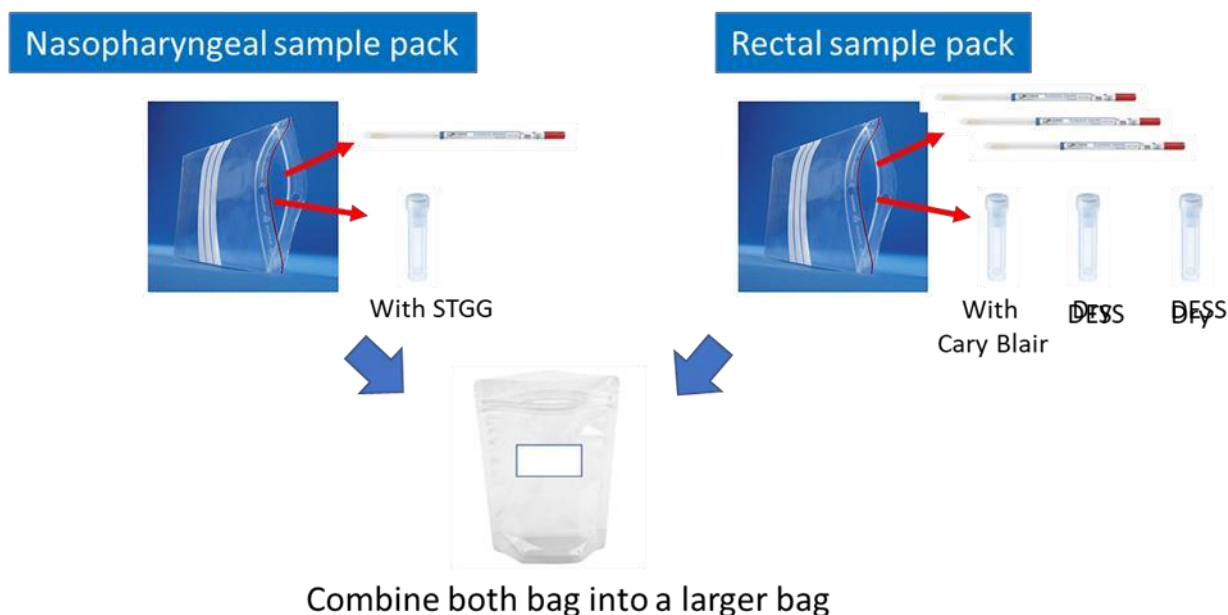
#### **4. Définitions et instructions générales**

##### **4.1. Définitions**

**4.1.1.** Technicien de laboratoire/scientifique : membre du personnel de LAKANA responsable de la collecte des échantillons pour les sous-études RAM et mécanistique, de l'enregistrement des échantillons et de l'organisation du transport vers le laboratoire.

##### **4.2. Instructions générales**

Diagramme sur la façon d'assembler le lot de collecte



## 5. Procédures étape par étape

### 5.1. Préparation des milieux et aliquotage

5.1.1. Préparez le STGG comme indiqué dans l'annexe 1.

5.1.2. Préparez le milieu Cary Blair comme indiqué dans l'annexe 2.

5.1.3. Préparez le milieu DESS comme indiqué dans l'annexe 3.

5.1.4. Si le milieu a été préparé à l'avance et conservé au réfrigérateur, vérifiez la date de péremption et assurez-vous que le milieu n'est pas contaminé (transparent, non trouble).

5.1.5. En utilisant des techniques aseptiques, aliquotez 1 mL de milieu STGG dans un tube stérile à bouchon à vis de 2 mL et fermez le couvercle hermétiquement. Étiquetez le tube avec STGG.

5.1.6. En utilisant des techniques aseptiques, aliquotez 1 mL de milieu Cary Blair dans un tube stérile à bouchon à vis de 2 mL et fermez le couvercle hermétiquement. Étiquetez le tube avec CB.

5.1.7. En utilisant des techniques aseptiques, aliquotez 1 mL de milieu DESS dans un tube stérile à bouchon à vis de 2 mL et fermez le couvercle hermétiquement. Étiquetez le tube avec DESS.

5.1.8. Si le milieu a été aliquoté dans des tubes à l'avance et conservé au réfrigérateur, vérifiez la date de péremption et assurez-vous que le milieu n'est pas contaminé.

(transparent, non trouble, il peut y avoir des précipitations de sel qui ne devraient pas influencer la performance du DESS).

**5.1.9.** Répétez l'opération si nécessaire.

## **5.2. Assemblage du lot nasopharyngé**

**5.2.1.** Étiquetez un sac à fermeture éclair avec la mention « NP ». Placez un autocollant vierge sur le sac.

**5.2.2.** Inscrivez « STGG » sur un tube stérile à bouchon à vis et apposez-y une étiquette à code-barres unique pré-imprimée. Le mot « STGG » sera écrit à la fois sur le bouchon et sur la partie supérieure du tube pour s'assurer qu'il est bien visible avec une étiquette à code-barres. L'équipe de terrain scanne le code-barres sur la tablette lors du prélèvement de l'échantillon.

**5.2.3.** Placez le tube STGG étiqueté et un écouvillon nasopharyngé individuel emballé (écouvillon Copan - 503CS01) dans le sac « NP » étiqueté et fermez-le.

## **5.3. Assemblage du lot rectal**

**5.3.1.** Étiquetez un sac à fermeture éclair avec la mention « Rectal ». Placez un autocollant vierge sur le sac.

**5.3.2.** Inscrivez « CB » sur un tube stérile à bouchon à vis et apposez-y une étiquette à code-barres unique pré-imprimée. Le mot « CB » sera écrit à la fois sur le bouchon et sur la partie supérieure du tube afin de s'assurer qu'il soit bien visible avec une étiquette à code-barres. L'équipe de terrain scanne le codebarres sur la tablette lors du prélèvement de l'échantillon.

**5.3.3.** Inscrivez « DESS » sur un tube stérile à bouchon à vis et apposez-y une étiquette à code-barres unique pré-imprimée. Le mot « DESS » sera écrit à la fois sur le bouchon et sur la partie supérieure du tube pour s'assurer qu'il est bien visible avec une étiquette à code-barres. L'équipe de terrain scanne le code-barres sur la tablette lors du prélèvement de l'échantillon.

**5.3.4.** Apposez une étiquette pré-imprimée à code-barres unique sur un autre tube stérile vide à bouchon à vis de 2 mL.

**5.3.5.** Placez le tube étiqueté CB, le tube DESS, le tube stérile vide et 3 écouvillons avec un point de rupture de 30 mm (écouvillon Copan - 520CS01), dans le sac « Rectal » étiqueté et fermez.

## **5.4. Assemblage du sac de collecte d'échantillons**

**5.4.1.** Collez un autocollant vierge sur un grand sac à fermeture éclair.

- 5.4.2.** Placez le sac « NP » et le sac « Rectal » dans le grand sac à fermeture éclair, en vous assurant que tous les sacs contiennent le matériel mentionné ci-dessus et fermez-les.
- 5.4.3.** Le sac de collecte est maintenant prêt. Tout doit être conservé entre 2 et 8°C et envoyé aux CSComs et, de là, aux villages, dans des glacières entre 2 et 8°C.
- 5.5. Assemblage de sacs supplémentaires d'écouvillons floqués**
- 5.5.1.** Étiquetez un sac à fermeture éclair avec « écouvillons NP supplémentaires ».
- 5.5.2.** Placez 20 écouvillons nasopharyngés individuels emballés (écouvillons Copan - 503CS01) dans le sac étiqueté « écouvillons NP supplémentaires » et fermez-le.
- 5.5.3.** Étiquetez un sac à fermeture éclair avec « écouvillons rectaux supplémentaires ».
- 5.5.4.** Placez 20 écouvillons avec un point de rupture de 30 mm (écouvillons Copan - 520CS01) dans le sac étiqueté « écouvillons rectaux supplémentaires » et fermez-le.

**Note :** Avant d'imprimer l'étiquette avec le code-barres, le personnel de laboratoire utilisera une étiquette manuscrite, établie avec l'infirmière de l'étude, pour étiqueter les flacons d'échantillons collectés.

- Dans le futur, le personnel de laboratoire commencera à étiqueter les flacons à la main lorsqu'il prépare les sacs d'échantillons au laboratoire. Veuillez utiliser le format suivant – le texte en noir doit être écrit par le personnel du laboratoire et **la partie en rouge par l'infirmière sur le terrain**. Le personnel de laboratoire laissera un espace sur l'étiquette pour que l'infirmière de l'étude puisse le remplir.

**LAKANA-AMR**

**MDA1, milieu** (CB, DESS, sec ou STGG)

**Type d'échantillon** (écouvillon rectal ou NP) - **numéro de flacon** (1, 2, 3 ou 5)

**ID de l'enfant**

**Âge de l'enfant (groupe d'âge en mois)**

**Date du prélèvement de l'échantillon**

- Si les sacs d'échantillons sont déjà expédiés du laboratoire vers le terrain sans information manuscrite au préalable, l'infirmière de l'étude doit étiqueter à la main les informations suivantes sur les flacons d'échantillons avec un stylo à pointe fine :

**LAKANA-AMR, MDA1 (ou version courte LA1)**

**ID de l'enfant (ceci DOIT être clair et lisible)**

**Âge de l'enfant (groupe d'âge en mois)**

**Date du prélèvement de l'échantillon**

- Si les flacons d'échantillons prélevés sur le même enfant se trouvent dans le plus grand sac, les informations détaillées doivent également être marquées sur le plus

grand sac, afin que le personnel du laboratoire puisse reconnaître facilement les échantillons.

- Le carnet de bord des échantillons rempli par l'infirmière de l'étude doit être transporté avec les échantillons collectés au laboratoire de Kita. Le personnel du laboratoire doit vérifier la concordance entre les flacons d'échantillons et le carnet de bord et prendre une photo de la page du carnet de bord qu'il/elle a reçue pour vérifier les informations marquées sur le flacon d'échantillons.

## 6. Problèmes de sécurité au travail

Tous les membres de l'équipe d'étude qui réalisent cette POS doivent être formés aux bonnes pratiques de laboratoire clinique.

## 7. Assurance Qualité / Contrôle Qualité

Tout le personnel de l'étude qui préparera les sacs d'échantillons suivra une formation pratique. Le personnel de l'étude ne sera pas autorisé à assembler les sacs tant qu'un superviseur n'aura pas évalué ses compétences et signé dans le registre de formation.

## 8. Annexes et autres documents connexes

Numéro du document	Contenu du document
Annexe 1	Préparation du STGG
Annexe 2	Préparation du milieu de Cary Blair
Annexe 3	Préparation du DESS

## 9. Historique des versions, auteurs et approbations

Version (date)	Modifications du texte de la POS (auteur)
2.0 (2021-04-20)	Ajout d'une "Note" d'instruction par rapport aux informations manuscrites sur les étiquettes des flacons d'échantillons par le personnel de laboratoire et l'infirmière de l'étude lorsque les étiquettes à code-barres ne sont pas disponibles. Approuvée par le PSG de LAKANA le 20 avril 2021.
1.0 (09.03.2021)	Rédigée par Dagmar Alber, Elaine Cloutman-Green et Yuemei Fan. Approuvée par le PSG LAKANA le 9 mars 2021.

## **Annexe 1 : Préparation du STGG**

### Pour 100 ml de milieu STGG

#### Ingrédients :

1. lait écrémé - 2 g
2. bouillon de soja trypticase - 3 g
3. glucose - 0,5 g
4. glycérol - 10 ml
5. eau distillée - 90 ml

#### Procédure

Tous les ingrédients sont mélangés dans un récipient autoclavable et autoclavés à une température de 116° C, sous une pression de 15 lbs pendant 15 minutes. On laisse le STGG refroidir à la température ambiante. Datez le milieu et donnez-lui un numéro de lot. Enregistrez la date de péremption (six mois à partir du jour de la préparation). Le milieu est maintenant prêt à être aliquoté aseptiquement dans des tubes de 2 ml à bouchon à vis. Les milieux ou tubes préparés à l'avance doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Avant de procéder à l'aliquotage, agitez le milieu au vortex pendant 20 secondes.

Si possible, la totalité des 3000 ml peut être fabriquée avec le même lot de milieu et faire plusieurs paquets.

Testez la stérilité des milieux une semaine avant l'utilisation du lot en plaçant le volume entier d'un tube de chaque numéro de lot sur de la gélose Trypticase soja avec 5 % de sang de mouton et en incubant la plaque à 37° C pendant 48 heures dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. Si la croissance d'un organisme quelconque est observée, jetez le lot.

## **Annexe 2 : Préparation du milieu Cary Blair**

Ingrédients :

Milieu de transport Thermo Scientific Cary-Blair (déshydraté) Eau distillée

Préparez le milieu selon les instructions du fabricant. Dated le milieu et donnez-lui un numéro de lot. Notez la date de péremption (1 an à partir de la date de préparation). Le milieu est maintenant prêt à être aliquoté aseptiquement dans des tubes à bouchon à vis de 2 ml. Les milieux ou tubes préparés à l'avance doivent être conservés au réfrigérateur à 2°-8°C.

Si possible, la totalité des 3000 ml peut être fabriquée avec le même lot de milieu et faire plusieurs lots.

Testez la stérilité des milieux une semaine avant l'utilisation du lot en plaçant le volume entier d'un tube de chaque numéro de lot sur de la gélose Trypticase soja avec 5 % de sang de mouton et en incubant la plaque à 37° C pendant 48 heures dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. Si la croissance d'un organisme quelconque est observée, jetez le lot.



**Annexe 3 : Préparation du DMSO/EDTA/chlorure de sodium saturé (DESS) Préparer de l'EDTA 0.5M s'il n'est pas disponible :**

EDTA disodique FW 374.24	372,24 g
NaOH 5 M	Pour amener le pH de l'EDTA à 8.0
Eau désionisée	Pour amener le volume final à 2 L

1. Mesurez 372,24 g d'EDTA disodique, ajoutez 500 ml d'eau déminéralisée à l'EDTA et suffisamment de NaOH 5 M pour obtenir un pH de 8,0 (cela peut représenter jusqu'à 500 ml dans certains cas). Veuillez noter que l'EDTA ne se dissoudra pas si le pH est inférieur à 7,0. Il faut donc ajouter suffisamment de NaOH 5 M pour dissoudre l'EDTA. Cela peut prendre plusieurs heures. Une fois la dissolution terminée, ajustez le pH à 8,0 à l'aide d'un pH-mètre ou de papier pH.

Veillez à utiliser du sel EDTA disodique, sinon il faudra plus de NaOH pour le pH de l'EDTA.

2. Amenez le volume final à 2 L avec de l'eau désionisée.

Pour 2 L de milieu DESS

Ingrédients :

1. EDTA disodique 0,5 M – 1 L
2. Sulfoxyde de diméthyle (DMSO) – 400 mL
3. Eau désionisée (stérile) - 600 mL
4. NaCl - Assez pour saturer la solution ~300 g

Procédure

Mesurez et mélangez les trois premiers produits chimiques.

Ajoutez suffisamment de NaCl pour saturer la solution (environ 300 à 400 g, cela peut varier en fonction de plusieurs facteurs dont la température ambiante. Il est donc préférable d'ajouter

300 grammes et si tout se dissout, ajoutez du sel jusqu'à ce qu'il semble ne plus se dissoudre) et dissolvez. Cela peut prendre plusieurs minutes, voire plusieurs heures, alors soyez patient.

Veillez à conserver la solution dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière (enveloppez le flacon dans du papier d'aluminium). L'apparition de cristaux est normale et ne devrait pas influencer les performances. Cependant, veillez à ce que la solution ne devienne pas trouble. Si cela se produit, jetez-la et préparez-en une nouvelle.