

# Réseau de laboratoires et nouveau modèle de programme d'évaluation externe de la qualité des tests de diagnostic par PCR de l'**ulcère de Buruli** dans la Région africaine de l'OMS

Mandat



Ulcère de Buruli



Organisation  
mondiale de la Santé



# Réseau de laboratoires et nouveau modèle de programme d'évaluation externe de la qualité des tests de diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli dans la Région africaine de l'OMS

## Mandat



Réseau de laboratoires et nouveau modèle de programme d'évaluation externe de la qualité des tests de diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli dans les pays d'endémie africains : mandat [Buruli ulcer laboratory network and new external quality assessment programme for PCR-based diagnosis in the WHO African Region: terms of reference]

ISBN 978-92-4-001611-8 (version électronique)

ISBN 978-92-4-001612-5 (version imprimée)

© Organisation mondiale de la Santé, 2020

Certains droits réservés. La présente publication est disponible sous la licence Creative Commons Attribution – Pas d'utilisation commerciale – Partage dans les mêmes conditions 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO ; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

Aux termes de cette licence, vous pouvez copier, distribuer et adapter l'œuvre à des fins non commerciales, pour autant que l'œuvre soit citée de manière appropriée, comme il est indiqué ci-dessous. Dans l'utilisation qui sera faite de l'œuvre, quelle qu'elle soit, il ne devra pas être suggéré que l'OMS approuve une organisation, des produits ou des services particuliers. L'utilisation de l'emblème de l'OMS est interdite. Si vous adaptez cette œuvre, vous êtes tenu de diffuser toute nouvelle œuvre sous la même licence Creative Commons ou sous une licence équivalente. Si vous traduisez cette œuvre, il vous est demandé d'ajouter la clause de non responsabilité suivante à la citation suggérée : « La présente traduction n'a pas été établie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). L'OMS ne saurait être tenue pour responsable du contenu ou de l'exactitude de la présente traduction. L'édition originale anglaise est l'édition authentique qui fait foi ».

Toute médiation relative à un différend survenu dans le cadre de la licence sera menée conformément au Règlement de médiation de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle.

**Citation suggérée.** Réseau de laboratoires et nouveau modèle de programme d'évaluation externe de la qualité des tests de diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli dans les pays d'endémie africains : mandat [Buruli ulcer laboratory network and new external quality assessment programme for PCR-based diagnosis in the WHO African Region: terms of reference]. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

**Données de catalogage à la source.** Les données de catalogage à la source sont disponibles à l'adresse <http://apps.who.int/iris>.

**Ventes, droits et licences.** Pour acheter les publications de l'OMS, voir <http://apps.who.int/bookorders>. Pour soumettre une demande en vue d'un usage commercial ou une demande concernant les droits et licences, voir <http://www.who.int/about/licensing>.

**Matériel attribué à des tiers.** Si vous souhaitez réutiliser du matériel figurant dans la présente œuvre qui est attribué à un tiers, tel que des tableaux, figures ou images, il vous appartient de déterminer si une permission doit être obtenue pour un tel usage et d'obtenir cette permission du titulaire du droit d'auteur. L'utilisateur s'expose seul au risque de plaintes résultant d'une infraction au droit d'auteur dont est titulaire un tiers sur un élément de la présente œuvre.

**Clause générale de non responsabilité.** Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les traits discontinus formés d'une succession de points ou de tirets sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'OMS, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'OMS ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

## Table des matières

Remerciements	iv
Sigles et abréviations	v
1. Contexte	1
1.1 Le Centre Pasteur du Cameroun	1
2. Objectifs	3
3. Champ d'action	4
3.1 Harmonisation des modes opératoires normalisés	4
3.2 Mise en place officielle du réseau de laboratoires	4
3.3 Fonctionnement du réseau	6
3.4 Mise en œuvre du nouveau programme d'évaluation externe de la qualité	7
Annexe 1. Modes opératoires normalisés pour le prélèvement, le transport et le stockage des échantillons (MON1)	8
Annexe 2. Modes opératoires normalisés pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR (MON2)	11
Annexe 3A. Modes opératoires normalisés pour l'extraction et la purification de l'ADN de <i>Mycobacterium ulcerans</i> avec un témoin positif interne (MON3A)	14
Annexe 3B. Modes opératoires normalisés pour l'extraction et la purification de l'ADN de <i>Mycobacterium ulcerans</i> sans témoin positif interne (MON3B)	16
Annexe 4A. Modes opératoires normalisés pour la préparation d'une analyse PCR quantitative en temps réel avec un témoin positif interne (MON4A)	19
Annexe 4B. Modes opératoires normalisés pour la préparation d'une analyse PCR en temps réel sans témoin positif interne (MON4B)	22

## Remerciements

Ce document a été rédigé par les Docteur Sara Eyangoh (Centre Pasteur du Cameroun), Estelle Marion (Université d'Angers) et Sundeep Chaitanya V (American Leprosy Missions). Il a été examiné par les membres du réseau de laboratoire sur l'ulcère de Buruli et validé par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Le Centre Pasteur du Cameroun a coordonné ce travail.

Les modes opératoires normalisés annexés à ce document ont été rédigés par Docteur Sara Eyangoh, Docteur Estelle Marion et Monsieur Numfor Hycenth. Ils ont été examinés par les membres du réseau de laboratoire sur l'ulcère de Buruli et validés par le Conseil consultatif.

## Sigles et abréviations

CPC	Centre Pasteur du Cameroun
EEQ	Évaluation externe de la qualité
IMT	Institut de médecine tropicale
MON	Modes opératoires normalisés
MTN	Maladies tropicales négligées
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
RIIP	Réseau International des Instituts Pasteur



# 1. Contexte

Depuis 2009, l'Institut de médecine tropicale (IMT) d'Anvers (Belgique) gère un programme biennal d'évaluation externe de la qualité (EEQ) destiné à examiner les compétences des laboratoires assurant un diagnostic de l'ulcère de Buruli par des méthodes de détection moléculaire de *Mycobacterium ulcerans* dans les échantillons cliniques. Le quatrième cycle d'EEQ, organisé en 2018, est le dernier à avoir été mené par l'IMT. Lors de la 12<sup>e</sup> réunion du Groupe consultatif technique de l'OMS sur l'ulcère de Buruli, qui s'est tenue à Genève le 27 mars 2019, l'IMT a annoncé qu'il allait mettre un terme à son programme d'EEQ.

Le Groupe a donc recommandé que la responsabilité de l'EEQ soit confiée à un pays africain où l'ulcère de Buruli est endémique, pour assurer la pérennité du programme. En parallèle, les données communiquées par les administrateurs des programmes nationaux lors d'une réunion sur l'ulcère de Buruli (à Genève du 25 au 27 mars 2019) ont mis en évidence la persistance d'un taux médiocre de confirmation des cas par la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). L'OMS estime donc qu'il est urgent d'analyser l'impact des quatre cycles précédents d'évaluation externe pour déterminer la marche à suivre à l'avenir.

Au total, 18 laboratoires, répartis dans 13 pays, ont participé aux quatre cycles d'EEQ ; 10 de ces laboratoires étaient situés dans huit pays d'endémie africains, quatre d'entre eux ayant participé aux quatre cycles dans leur intégralité et trois ayant pris part à trois cycles. Les résultats globaux révèlent une amélioration de la performance médiane de ces laboratoires au cours des quatre cycles d'évaluation. Toutefois, la proportion de laboratoires obtenant des résultats faussement positifs reste élevée et est révélatrice d'un problème de spécificité, probablement lié à une contamination. La proportion de laboratoires ayant obtenu à la fois des résultats faux positifs et faux négatifs soulève des questions quant à la qualité des données communiquées à l'OMS en Afrique et à la fiabilité des résultats des études menées dans ces différents laboratoires de divers pays.

Étant donné que l'IMT a mis fin au processus d'évaluation, il convient de proposer un modèle susceptible d'améliorer la performance des laboratoires pratiquant le diagnostic moléculaire de l'ulcère de Buruli dans les pays d'endémie d'Afrique afin de garantir un diagnostic correct pour les patients et l'enregistrement par l'OMS de données exactes, fiables et comparables à celles d'autres continents, comme l'Australie.

L'OMS prévoit de transférer la responsabilité du programme d'EEQ à un laboratoire volontaire d'un pays d'endémie africain ayant obtenu de bons résultats lors des quatre cycles d'EEQ. Le Service de mycobactériologie du Centre Pasteur du Cameroun a été reconnu comme l'un des laboratoires enregistrant les meilleures performances. Il dispose en outre des moyens et de l'expérience nécessaire pour mettre en œuvre et gérer le nouveau programme d'EEQ.

## 1.1. Le Centre Pasteur du Cameroun

Le Centre Pasteur du Cameroun (CPC), membre du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP) depuis 60 ans, est un établissement administratif public. Il sert déjà de laboratoire OMS national et régional pour de nombreuses maladies infectieuses, dont la poliomyélite, la fièvre jaune, la rougeole et la grippe, et de laboratoire national de référence pour d'autres maladies, comme la tuberculose, l'ulcère de Buruli, la méningite, le choléra, le VIH, les arbovirus et la fièvre hémorragique virale.

Avec l'appui de l'OMS, de la Fondation Raoul Follereau, de la Fondation Sanofi Espoir et du RIIP, le Service de mycobactériologie du CPC a organisé quatre séances de formation sur la microbiologie de *M. ulcerans* (en janvier 2006, septembre 2007, novembre 2009 et novembre 2011) pour renforcer les capacités techniques, faciliter la mise en œuvre nationale de la détection moléculaire de *M. ulcerans* et améliorer la qualité du diagnostic clinique. Outre le personnel camerounais, quelques 50 professionnels de la santé, biologistes et techniciens venus de 11 pays (Bénin, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée Conakry, Nigéria, Ouganda, République centrafricaine, République démocratique du Congo et Togo) ont bénéficié de cette formation. Le CPC a également mené divers programmes de recherche sur l'ulcère de Buruli et publié de nombreux articles dans des revues à comité de lecture.

Le laboratoire est dirigé par une scientifique chevronnée dont la compétence est reconnue dans ce domaine et qui est membre du Groupe d'examen du programme régional de prise en charge des cas du Bureau régional OMS de l'Afrique. Ce laboratoire entretient une collaboration étroite avec l'Université d'Angers (équipe dirigée par le Dr Laurent Marsollier) et a appuyé les activités proposées. L'équipe du Dr Marsollier a une vaste expérience du diagnostic de l'ulcère de Buruli sur le terrain et a contribué à l'établissement du laboratoire de PCR à l'hôpital de Pobé au Bénin par le biais d'un modèle de mentorat semestriel. Récemment, le laboratoire a bénéficié du soutien de l'OMS pour intégrer le diagnostic différentiel moléculaire du pian dans sa plateforme PCR.

## 2. Objectifs

L'objectif principal est d'établir un nouveau programme d'EEQ s'appuyant sur un réseau solide de laboratoires assurant un diagnostic de haute performance par PCR de l'ulcère de Buruli dans les pays d'endémie africains.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- établir un mode opératoire normalisé pour le diagnostic par PCR en tenant compte du contexte particulier et du matériel disponible ;
- créer officiellement un réseau fonctionnel de laboratoires ;
- mettre en place un programme d'EEQ ; et
- offrir une formation et un soutien aux laboratoires de la sous-région.

## 3. Champ d'action

### 3.1 Harmonisation des modes opératoires normalisés

#### 3.1.1 Objectif

L'objectif est de proposer, d'adopter et de diffuser des modes opératoires normalisés (MON) pour la détection par PCR de *M. ulcerans*, qui permettront de garantir une analyse appropriée des échantillons, d'obtenir des résultats comparables entre les pays, d'améliorer la qualité des données communiquées à l'OMS et d'optimiser ainsi l'EEQ (mise en place des systèmes de répétition des contrôles/tests) pour qu'elle puisse guider au mieux les améliorations à apporter.

#### 3.1.2 Méthodes

À des fins de standardisation, le Centre de coordination s'emploiera à :

- examiner et dresser l'inventaire de toutes les procédures employées dans les 10 laboratoires des huit pays participants en recueillant et regroupant des informations sur les procédures suivantes, avec l'appui de l'OMS :
  - le prélèvement, le stockage et le transport des échantillons ;
  - les protocoles d'extraction et de purification de l'ADN ;
  - les protocoles d'amplification de l'ADN (mélange réactionnel et méthodes d'amplification) ;
  - les témoins positifs d'ADN utilisés pour la courbe d'étalonnage ;
  - la sensibilité de détection ;
- comparer les procédures et les méthodes au regard des critères suivants :
  - faisabilité
  - coût
  - solidité
  - répétabilité
  - sensibilité et spécificité (sur la base des résultats obtenus, des MON harmonisés seront rédigés); et
- adopter des MON harmonisés pour tous les laboratoires qui pratiquent le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli lors de la réunion sur l'ulcère de Buruli (Yaoundé, octobre/novembre 2019) et identifier la méthode d'EEQ présentant le meilleur rapport coût/efficacité, avec une liste des produits essentiels pour garantir une analyse adéquate des échantillons dans tous les laboratoires..

#### 3.1.3 Résultats attendus

Les MON harmonisés seront adoptés et utilisés par tous les laboratoires afin que les futurs échantillons d'EEQ soient analysés de manière comparable aux échantillons ordinaires. Les laboratoires membres devront s'engager à respecter les MON recommandés pour pouvoir participer au réseau de laboratoires et au programme d'EEQ.

## 3.2 Mise en place officielle du réseau de laboratoires

### 3.2.1 Objectif

L'objectif est d'établir un réseau fonctionnel regroupant tous les laboratoires qui pratiquent le diagnostic de l'ulcère de Buruli dans tous les pays d'endémie en Afrique. Le rôle du réseau de laboratoires sur l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) est de fournir en continu des orientations et des avis techniques pour garantir une analyse adéquate des échantillons dans tous les laboratoires et optimiser l'EEQ en vue d'une amélioration constante des performances. Le réseau veillera à ce que les données soient correctement recueillies et transmises aux programmes nationaux et à l'OMS. Il offrira également une plateforme solide de conseil et d'aide aux pays dépourvus des capacités nécessaires à la confirmation des cas, avec les objectifs suivants :

- désigner un centre de coordination ;
- utiliser, promouvoir et diffuser les méthodes validées par le BU-LABNET ;
- mettre au point des produits et réactifs de référence pour le BU-LABNET afin de garantir l'exactitude et la fiabilité des résultats d'analyse et faciliter le processus d'approvisionnement ;
- mener et/ou coordonner des études scientifiques et techniques en collaboration avec d'autres laboratoires ;
- offrir une formation scientifique et technique au personnel des pays endémique ;
- organiser et participer à des réunions scientifiques ; et
- proposer, après discussion, une stratégie intégrée pour d'autres MTN.

### 3.2.2 Fonctionnement du réseau

Le réseau fonctionnera comme suit.

**Membres :** Laboratoires situés dans des pays d'endémie qui pratiquent le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli : Bénin (2 laboratoires), Cameroun (Centre de coordination), Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana (2 laboratoires), Libéria, Nigéria, République démocratique du Congo et Togo.

**Groupe consultatif du réseau :** Représentants du Centre de coordination (Cameroun), OMS, membres extérieurs (avec des intérêts axés sur le diagnostic en laboratoire), un représentant du BU-LABNET et des experts. Le Groupe consultatif aura pour responsabilité de :

- promouvoir la collaboration ;
- faciliter la bonne mise en œuvre, l'adoption et l'utilisation du réseau ; et
- veiller à ce que l'accent continue d'être mis sur le champ d'application convenu et les résultats et avantages escomptés.

### Calendrier des réunions

- Groupe d'experts et Centre de coordination - réunions annuelles (voir détails ci-après)
- Groupe consultatif - réunions par Skype selon les besoins, sous la coordination du Centre de coordination
- Réunions du réseau - première réunion en octobre/novembre 2019 (Centre de coordination, Yaoundé). La deuxième réunion se tiendra probablement en marge de la prochaine réunion de l'OMS sur l'ulcère de Buruli (OMS, Genève).

## Activités du réseau

**Composition:** le réseau sera constitué des laboratoires membres et des États Membres correspondants.

## Activités

Les activités suivantes seront menées :

- Le Centre de coordination définira le mandat du groupe d'experts et du groupe consultatif du réseau.
- La première réunion du réseau se tiendra au CPC, à Yaoundé (Cameroun) en octobre/novembre 2019. Les MON harmonisés seront transmis à tous les laboratoires membres lors de la réunion.
- Des membres du groupe d'experts visiteront les laboratoires pour en évaluer les installations, l'infrastructure, les besoins en formation et les réactifs et produits renouvelables requis. Des questionnaires élaborés au préalable par le Centre de coordination seront utilisés pour évaluer la performance. Les visites dans les laboratoires membres seront réparties entre les membres du groupe d'experts ; chaque expert visitera 1 à 3 laboratoires. **Ces visites auront lieu au début 2020.**
- À l'issue des visites, le groupe d'experts communiquera ses évaluations au Centre de coordination en vue d'une diffusion des rapports et des recommandations aux laboratoires membres respectifs.
- Les besoins relatifs aux infrastructures et aux produits renouvelables seront examinés lors de la réunion du groupe d'experts et un rapport détaillé sera rédigé et soumis à l'OMS. Si l'appui nécessaire est accordé, l'OMS/le Centre de coordination distribuera les matériels requis aux laboratoires.
- Selon les besoins en formation identifiés, le Centre de coordination organisera des séances de formation à l'intention du personnel et des techniciens, qui se tiendront au CPC ou dans tout autre laboratoire membre que le CPC aura reconnu comme étant à même de former le personnel aux MON. Les besoins budgétaires liés à la formation seront soumis sous forme de proposition par le Centre de coordination à l'OMS, après consultation avec le groupe d'experts.
- Le Centre de coordination élaborera ensuite des questionnaires ou formulaires qu'il enverra tous les 3 mois aux laboratoires membres pour recueillir des informations sur les MON, les produits renouvelables et l'évolution éventuelle des infrastructures. Un rapport sera établi à partir des mises à jour transmises par les laboratoires membres et sera présenté au groupe d'experts chaque année. Le groupe d'experts se réunira une fois par an, à un endroit proposé par le Centre de coordination, afin d'examiner les améliorations à apporter et d'émettre des recommandations. Le Centre de coordination, de concert avec le groupe d'experts, rédigera un rapport sur les délibérations et les conclusions de ces réunions, qu'il transmettra à l'OMS.
- Le groupe d'experts et le Centre de coordination prendront également note des besoins en matière de recherche qui auront été identifiés lors des réunions du groupe d'experts et élaboreront des propositions de recherche collaborative selon les besoins.
- Le Centre de coordination communiquera à l'OMS les besoins éventuels des laboratoires membres en matériels et produits renouvelables pour en faciliter l'achat.
- Le réseau tissera également des liens avec les pays voisins (non États Membres) ayant détecté des cas suspects d'ulcère de Buruli pour les aider à confirmer le diagnostic.

### 3.2.3 Réactifs et produits renouvelables essentiels – matériels clés

Une fois que les protocoles de confirmation par PCR auront été harmonisés et approuvés par tous les membres du réseau, il sera indispensable de favoriser l'accès aux produits essentiels et d'en faciliter l'expédition. Pour participer au programme, les laboratoires de biologie moléculaire doivent déjà disposer d'équipements de base en bon état de fonctionnement, notamment des enceintes de sécurité biologique, des pipettes, des centrifugeuses, des congélateurs, des réfrigérateurs, des agitateurs thermostatés et des instruments de PCR en temps réel.

Une autre solution serait que l'OMS, par l'entremise d'organisations non gouvernementales, aide le réseau à faciliter l'accès des laboratoires aux matériels essentiels.

Matériels essentiels (liste sujette à modification) :

- mélange réactionnel de qPCR
- ADN étalon
- sondes et amorces IS2404
- kit de purification

Selon les données dont dispose l'OMS, on estime que le nombre d'échantillons pour PCR provenant des huit pays représentera environ 5000 PCR par an.

### 3.3 Fonctionnement du Centre de coordination

L'objectif principal du Centre de coordination sera d'établir un réseau regroupant des laboratoires affichant de bons résultats de PCR dans les pays africains où l'ulcère de Buruli est endémique. À cette fin et pour garantir une bonne coordination du réseau, le CPC recevra des fonds spécifiquement consacrés au recrutement d'un directeur de programme et d'un technicien.

**Le directeur de programme (temps plein) sera recruté par le Centre de coordination et rémunéré conformément à la grille salariale du CPC. Le titulaire de ce poste aura les responsabilités suivantes :**

- communication avec le réseau, y compris diffusion des courriers électroniques provenant des membres ;
- stockage de tous les documents, y compris les formulaires et les documents d'information reçus de chaque pays ;
- organisation des activités programmatiques, notamment les visites, formations et réunions ;
- rédaction de rapports trimestriels décrivant les activités de chaque laboratoire et les autres activités du réseau ;
- organisation du programme de contrôle de la qualité, avec l'appui du technicien ; et
- rédaction de la stratégie intégrée pour les MTN.

**Le technicien (temps partiel à 50 %) sera recruté par le Centre de coordination et rémunéré conformément à la grille salariale du CPC. Le titulaire de ce poste aura les responsabilités suivantes :**

- collaboration avec l'équipe d'experts lors des visites de soutien dans d'autres laboratoires du réseau ;
- préparation des échantillons/souches de la série d'EEQ à distribuer aux laboratoires participants (deux fois par an) ;
- analyse des résultats obtenus par les laboratoires participants à la série d'EEQ ;
- préparation du rapport de suivi issu de l'analyse des résultats ; et
- participation aux efforts d'intégration d'autres MTN dans la plateforme PCR de confirmation des cas.

### 3.4 Mise en œuvre du nouveau programme d'évaluation externe de la qualité

#### 3.4.1 *Objet*

Le nouveau programme d'EEQ :

- suivra et évaluera en permanence les MON et l'infrastructure des laboratoires membres au travers du réseau de laboratoires (voir la section 3.2) ;
- fournira un appui à la formation et à la préparation de matériels et enverra aux laboratoires des séries d'échantillons en aveugle prétestés pour évaluer leur performance ; et
- sera mis en œuvre pour une période initiale de 5 ans, qui pourra être prolongée selon les besoins et la disponibilité des subventions nécessaires.

#### 3.4.2 *Fonctionnement*

Le Centre de coordination :

- élaborera et enverra des séries d'échantillons en aveugle prétestés aux laboratoires membres deux fois par an, puis recueillera les résultats et en fera une analyse comparative ;
- élaborera et diffusera les protocoles relatifs à l'envoi/l'analyse des séries d'échantillons (accompagnées de descriptions le cas échéant) à chaque laboratoire membre ; et
- enverra un rapport d'évaluation à chaque laboratoire membre et proposera un soutien à ceux qui auront obtenu des résultats insuffisants.

#### 3.4.3 *Contrôle de la qualité*

Le témoin positif étalon d'ADN sera soit acheté auprès de BEI Resources (<https://www.beiresources.org/>), soit préparé (extraction, purification, évaluation de la qualité et lyophilisation) au Mycobacterial Research Laboratory (Université de l'État du Colorado) avec la participation et sous la direction du Centre de coordination et de l'OMS. Ce même ADN sera partagé avec les laboratoires membres, qui établiront des courbes d'étalonnage et les compareront à celles du Centre de coordination.

# Annexes

## Annexe 1. Modes opératoires normalisés pour le prélèvement, le transport et le stockage des échantillons (MON1)

### A1.1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour le prélèvement, le transport et le stockage des échantillons cliniques destinés à la confirmation en laboratoire de l'ulcère de Buruli par analyse PCR (amplification en chaîne par polymérase). Les échantillons recueillis à des fins de diagnostic doivent être prélevés avant tout traitement. Compte tenu de la distribution hétérogène des mycobactéries dans les lésions, il convient de prélever au moins deux échantillons cliniques dans chaque lésion.

### A1.2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pratiquant le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A1.3 Documents connexes

Fiche de travail : demande de confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli par PCR.

### A1.4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes à bords décollés.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées ou dans les lésions ouvertes à bords fermés (non décollés).
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

#### A1.4.1 Prélèvement par écouvillonnage

1. Utiliser un écouvillon stérile unitaire.
2. Passer l'écouvillon sous les bords décollés de l'ulcération.
3. Après le prélèvement, replacer l'écouvillon dans son tube d'origine ; n'ajouter aucun liquide.
4. Il faut prélever au minimum deux échantillons par lésion ; s'il existe plusieurs lésions, procéder à deux écouvillonnages pour chaque lésion.

#### A1.4.2 Prélèvement par aspiration à l'aiguille fine

1. Verser 0,5 ml d'eau stérile dans un microtube avec bouchon à vis ou dans un tube sec Vacutainer pour prélèvement sanguin (bouchon rouge).
2. Il est aussi possible d'utiliser du sérum physiologique ou une solution saline avec tampon phosphate ; ne pas introduire de liquide dans la lésion.
3. Au moyen d'une aiguille de calibre 23 et d'une seringue de 2 ml, aspirer le liquide de la lésion fermée.
4. Verser le contenu de la seringue dans le microtube ou le tube Vacutainer contenant l'eau stérile.
5. Aspirer doucement une partie du liquide dans l'aiguille, puis l'expulser de nouveau dans le microtube. Pour veiller au transfert de tout l'échantillon, répéter cette procédure trois fois, puis fermer le microtube.

**Remarque : ne pas introduire de liquide dans la lésion.**

6. Répéter l'aspiration si la lésion est de grande taille.

### A1.5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A1.

### A1.6 Équipement

Sans objet.

### A1.7 Informations sur les patients

Tous les tubes d'échantillons doivent être hermétiquement clos. Il convient de les identifier en inscrivant au marqueur indélébile la date de prélèvement, ainsi que le nom de famille et le prénom du patient.

Si deux types d'échantillons ont été prélevés chez le patient (aspiration à l'aiguille fine et écouvillon) ou si le patient présente plusieurs lésions, envisager de soumettre les deux types d'échantillons à l'analyse.

L'envoi doit être accompagné d'une fiche d'information contenant un tableau récapitulatif des échantillons (voir Fiche de travail : demande de confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli par PCR).

### A1.8 Conditions de stockage

#### A1.8.1 Stockage des échantillons avant le transport vers le laboratoire

- Les échantillons doivent être conservés à 2-8 °C ou, sinon, à température ambiante dans un endroit sec.
- Le délai maximal d'attente avant le transport est de 1 semaine (2 semaines pour les pays fortement peuplés).

#### A1.8.2 Stockage des échantillons pendant le transport vers le laboratoire

- Les échantillons doivent être expédiés à température ambiante ou dans une boîte réfrigérante, selon la disponibilité.

#### A1.8.3 Stockage des échantillons au laboratoire

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons doivent être conservés à 2-8 °C jusqu'à leur traitement en vue de l'analyse par PCR. Voir également l'annexe 2 : Modes opératoires normalisés pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR (MON2).

### A1.9 Contrôle interne de la qualité

Sans objet

### A1.10 Mesures de sécurité

- Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et être jetés de manière appropriée.
- Jeter toutes les aiguilles dans un récipient de sécurité ou un collecteur d'objets piquants et tranchants.

### A1.11 Références bibliographiques

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

### A1.12 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

## Appendice A1. Liste de matériels et réactifs pour le prélèvement, le transport et le stockage des échantillons

Nom	Référence	Observations	Photos
Écouvillons : stériles et dans un tube	Par exemple : 8150CC (Gauss) ; 552C (Copan)	Il existe de nombreuses références ; les écouvillons doivent être conditionnés individuellement dans un tube.	
Aiguilles et seringues	Aiguilles de calibre 21 à 23 ; Seringues de 1 ml à 2 ml		
Microtube de 1,5 ml avec bouchon à vis	Par exemple : 39289 (Dutscher)	Vérifier que le bouchon est attaché au tube	
Tube sec Vacutainer (bouchon rouge)		Si aucun tube à bouchon vissé n'est disponible	
Eau stérile	Sans objet	Sans objet	Sans objet
Marqueur indélébile	Sans objet	Pointe à bille	Sans objet
Fiche de travail pour demander la confirmation de l'ulcère de Buruli	Utiliser la fiche de travail distribuée par le BU-LABNET	Sans objet	Sans objet
Conteneur de déchets pour jeter les écouvillons	Sans objet	Étanche	Sans objet
Collecteur d'objets piquants et tranchants / réceptacle de sécurité pour jeter les aiguilles	Sans objet	Étanche et résistant à la perforation (la photo ci-contre est fournie à titre d'exemple)	
Boîte de transport (facultatif)	Sans objet	Couvercle hermétique	Sans objet
Réfrigérateur pour le stockage des échantillons (facultatif)	Sans objet	2-8 °C	Sans objet
Gants	Sans objet	Non poudrés	Sans objet

## Annexe 2. Modes opératoires normalisés pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR (MON2)

### A2.1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour l'enregistrement et le traitement des échantillons destinés au diagnostic en laboratoire de l'ulcère de Buruli par analyse PCR (amplification en chaîne par polymérase).

### A2.2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pratiquant le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A2.3 Documents connexes

- Registre manuel pour l'ulcère de Buruli (formulaire BU 01)
- Formulaire de demande pour l'ulcère de Buruli (formulaire BU 03)

### A2.4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes à bords décollés.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées ou dans les lésions ouvertes à bords fermés (non décollés).
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

### A2.5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A2.

### A2.6 Équipement

Voir la liste fournie dans l'appendice A2.

### A2.7 Procédure d'enregistrement

Lorsque le laboratoire reçoit des échantillons destinés à la confirmation de l'ulcère de Buruli, il doit procéder à l'enregistrement et au traitement de ces échantillons le jour-même ou le lendemain selon la procédure suivante.

1. Pour enregistrer les échantillons, remplir le registre manuel (un registre informatique peut être utilisé à titre facultatif, mais un registre manuel doit être présent dans tous les cas). Les informations suivantes, tirées de la fiche de demande, sont consignées dans le registre manuel :
  - a. nom de la structure demandant l'analyse par PCR ;
  - b. prénom du patient ;
  - c. nom de famille du patient ;
  - d. date de prélèvement de l'échantillon ;
  - e. type de prélèvement ;
  - f. numéro en laboratoire de l'échantillon ;
  - g. données de PCR ;
  - h. résultats de PCR ; et
  - i. nombre de bacilles par ml.
2. Conserver dans un dossier la fiche de demande accompagnant les échantillons reçus.
3. Attribuer un « numéro en laboratoire de l'échantillon » à chaque nouvel échantillon ; assurer la continuité de la numérotation entre les échantillons.

## A2.8 Procédure de traitement des échantillons

Remarque : chaque tube doit être identifié à l'aide du numéro en laboratoire de l'échantillon.

### A2.8.1 Écouvillons secs

1. Réhydrater les écouvillons en les plaçant dans un tube de 15 ml contenant 2 ml d'eau stérile, puis agiter au vortex.
2. Normalement, au moins deux écouvillonnages ont été effectués pour chaque lésion ; regrouper tous les écouvillons d'une même lésion dans un seul tube de 15 ml.
3. Attendre au moins 5 minutes, puis agiter de nouveau au vortex.
4. Retirer les écouvillons du tube de 15 ml.
5. Pipeter 400 µl et les transvaser dans un microtube de 1,5 ml muni d'un bouchon à vis.
6. Verser le reste dans un microtube de 1,5 ml avec bouchon à vis en vue d'une coloration de Ziehl-Neelsen ; conserver le reste en réserve à -20 °C.

### A2.8.2 Aspiration à l'aiguille fine

1. Agiter au vortex le tube contenant le produit d'aspiration à l'aiguille fine.
2. Pipeter 400 µl et les transvaser dans un microtube muni d'un bouchon à vis en vue de l'étape d'extraction de l'ADN.
3. Si le volume est <500 µl, ajouter 500 µl d'eau avant de pipeter ; conserver le reste en réserve à -20 °C.
4. Conserver les tubes contenant 400 µl de suspension d'ADN à température ambiante pour procéder à l'extraction de l'ADN (voir Annexe 3A : Extraction et purification de l'ADN de *Mycobacterium ulcerans* avec un témoin positif interne (MON3A)), ou congeler à -20 °C jusqu'à ce que l'extraction de l'ADN puisse être effectuée.

## A2.9 Contrôle interne de la qualité

Sans objet

### A2.10 Mesures de sécurité

- Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et doivent être jetés de manière appropriée.
- Jeter toutes les aiguilles dans un récipient de sécurité ou un collecteur d'objets piquants et tranchants.

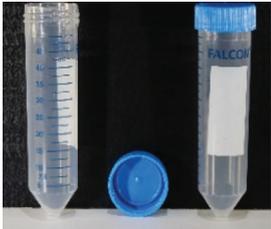
### A2.11 Références bibliographiques

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

### A2.12 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

Appendice A2. Liste de matériels et réactifs pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR

Nom	Référence	Observations	Photos
Registre manuel	Sans objet	Obtenu localement	Sans objet
Formulaire de demande pour l'ulcère de Buruli	Sans objet	Format propre au pays	Sans objet
Tubes Falcon de 50 ml (polypropylène, gradués, fond conique, bouchon à vis bleu, stérile)	Sans objet (p. ex. 227 261 Greiner Bio-One)	Résistants à la centrifugation	
Tubes Falcon de 15 ml (polypropylène, gradués, fond conique, bouchon à vis bleu, stérile)	Sans objet (p. ex. 188261 Greiner Bio-One)	Résistants à la centrifugation	
Eau stérile	Sans objet	Sans objet	Sans objet
Microtube de 1,5 ml avec bouchon à vis	Par exemple : 39289 (Dutscher)	Vérifier que le bouchon est attaché au tube	
Boîte de stockage	Sans objet	Boîte en plastique de préférence	Sans objet
Agitateur vortex	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	
Pipettes	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Pointes à filtre	Seront fournies par BU-LABNET en fonction des informations communiquées par les laboratoires concernant les pipettes	Laboratories will maintain currently used pipettes	Sans objet
Gants	Sans objet	Non poudrés	Sans objet
Blouses de laboratoire jetables	Sans objet	Pleine longueur, à manches longues	Sans objet
Congélateur à -20 °C	Sans objet	Pour stocker la suspension d'ADN avant l'extraction	Sans objet
Conteneur de déchets	Sans objet	Étanche	Sans objet

## Annexe 3A. Modes opératoires normalisés pour l'extraction et la purification de l'ADN de *Mycobacterium ulcerans* avec un témoin positif interne (MON3A)

### A3.A1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour l'extraction de l'ADN et la purification des échantillons en vue d'une analyse PCR (amplification en chaîne par polymérase) ciblant *Mycobacterium ulcerans*.

### A3.A2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pour le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A3.A3 Documents connexes

Aucun

### A3.A4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes à bords décollés.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées ou dans les lésions ouvertes à bords non décollés.
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

### A3.A5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A3.

### A3.A6 Équipement

Voir la liste fournie dans l'appendice A3.

### A3.A7 Procédure

#### A3.A7.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée par lyse bactérienne alcaline à l'aide du kit GenoLyse (Réf : 51610, Hain LifeScience).

1. Pour chaque échantillon, utiliser 400 µl de la suspension d'échantillon préparée au préalable et les transvaser dans un microtube avec bouchon à vis (voir Annexe 2 : Modes opératoires normalisés pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR (MON2)).
2. Centrifuger le tube à 12 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante.
3. Éliminer le surnageant en utilisant une pointe à filtre P1000 ; un culot pourra ou non être visible.
4. Remettre le culot en suspension dans 400 µl d'eau et centrifuger à 12 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante.
5. Éliminer le surnageant.
6. Remettre le culot en suspension dans 50 µl de tampon A-LYS.
7. Ajouter 10 µl d'ADN IPC (témoin interne, Diagenode, réf. : Dia-EIC/DNA-050).
8. Incuber pendant 10 minutes à 95 °C.
9. Centrifuger le tube pendant 10 secondes pour faire sédimenter la suspension.
10. Ajouter 50 µl de tampon A-NB pour neutraliser.
11. Conserver le tube à 4 °C s'il sera utilisé le jour-même pour l'amplification par PCR ; sinon, le conserver à -20 °C.

**Note: pour les échantillons prélevés par écouvillon et par aspiration à l'aiguille fine, l'étape de purification n'est pas nécessaire.**

#### A3.A7.2 Purification de l'ADN pour les échantillons de biopsie

Pour les échantillons de biopsie, il est recommandé de purifier l'ADN afin d'éliminer les traces d'inhibiteurs.

Utiliser le kit de purification QIAquick PCR (réf : 28106, QIAGEN) comme suit :

1. Ajouter 300 µl de tampon PB (tampon de liaison) à chaque échantillon, ainsi que 10 µl d'acétate de sodium 3M.
2. Charger l'échantillon dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
3. Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE (tampon de lavage) et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
4. Procéder à une seconde centrifugation sans ajout de tampon afin d'éliminer toute trace d'éthanol.
5. Éluer l'ADN en ajoutant 100 µl de tampon EB (tampon d'élution) et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
6. Conserver à 4 °C pour un stockage à court terme ou à -20 °C pour un stockage à long terme.

#### A3.A8 Contrôle interne de la qualité

Témoin positif interne.

#### A3.A9 Mesures de sécurité

Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et doivent être jetés de manière appropriée.

#### A3.A10 Références bibliographiques

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

#### A3.A11 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

## Annexe 3B. Modes opératoires normalisés pour l'extraction et la purification de l'ADN de *Mycobacterium ulcerans* sans témoin positif interne (MON3B)

### A3.B1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour l'extraction de l'ADN et la purification des échantillons en vue d'une analyse PCR (amplification en chaîne par polymérase) ciblant *Mycobacterium ulcerans*.

### A3.B2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pratiquant le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A3.B3 Documents connexes

Aucun

### A3.B4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes à bords décollés.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées ou dans les lésions ouvertes à bords non décollés.
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

### A3.B5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A3.

### A3.B6 Équipement

Voir la liste fournie dans l'appendice A3.

### A3.B7 Procédure

#### A3.B7.1 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait par lyse bactérienne alcaline à l'aide du kit GenoLyse (Réf : 51610, Hain LifeScience) comme suit :

1. Pour chaque échantillon, utiliser 400 µl de la suspension d'échantillon préparée au préalable et les transvaser dans un microtube avec bouchon à vis (voir Annexe 2 : Modes opératoires normalisés pour l'enregistrement et le traitement des échantillons avant l'analyse par PCR (MON2)).
2. Centrifuger le tube à 12 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante.
3. Éliminer le surnageant en utilisant une pointe à filtre P1000 ; un culot pourra ou non être visible.
4. Remettre le culot en suspension dans 400 µl d'eau et centrifuger à 12 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante.
5. Éliminer le surnageant.
6. Remettre le culot en suspension dans 50 µl de tampon A-LYS.
7. Incuber pendant 10 minutes à 95 °C.
8. Centrifuger le tube pendant 10 secondes pour faire sédimenter la suspension.
9. Ajouter 50 µl de tampon A-NB pour neutraliser.
10. Conserver le tube à 4 °C s'il sera utilisé le jour-même pour l'amplification par PCR ; sinon, le conserver à -20 °C.

**Remarque : pour les échantillons prélevés par écouvillon et par aspiration à l'aiguille fine, l'étape de purification n'est pas nécessaire.**

#### A3.B.7.2 Purification de l'ADN pour les échantillons de biopsie

Pour les échantillons de biopsie, il est recommandé de purifier l'ADN afin d'éliminer les traces d'inhibiteurs. Utiliser le kit de purification QIAquick (réf : 28106, QIAGEN) comme suit :

1. Ajouter 300 µl de tampon PB à chaque échantillon, ainsi que 10 µl d'acétate de sodium 3M.
2. Charger l'échantillon dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
3. Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
4. Procéder à une seconde centrifugation sans ajout de tampon afin d'éliminer toute trace d'éthanol.
5. Éluer l'ADN en ajoutant 100 µl de tampon EB et centrifuger pendant 1 minute à 5000 x g à température ambiante.
6. Conserver à 4 °C pour un stockage à court terme ou à -20 °C pour un stockage à long terme.

#### A3.B8 Contrôle interne de la qualité

Sans objet.

#### A3.B9 Mesures de sécurité

Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et doivent être jetés de manière appropriée.

#### A3.B10 Références bibliographiques

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

#### A3.B11 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

Appendice A3. Liste de matériels et réactifs pour l'extraction et la purification de l'ADN de *M. ulcerans*

Nom	Référence	Observations	Photos
Registre manuel	Sans objet	Obtenu localement	Sans objet
Eau stérile	Sans objet	Sans objet	Sans objet
Kit GenoLyse	51610, Hain LifeScience	Fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Kit de purification QIAquick PCR	28106, QIAGEN	Pour les échantillons de biopsie ; fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Agitateur vortex	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Pipettes	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Pointes à filtre	Seront fournies par BU-LABNET en fonction des informations communiquées par les laboratoires concernant les pipettes	Les laboratoires conserveront les pipettes actuellement utilisées	Sans objet
Gants	Sans objet	Non poudrés	Sans objet
Blouses de laboratoire jetables	Sans objet	Pleine longueur, à manches longues	Sans objet
Centrifugeuse	Tout modèle pouvant contenir des tubes de 1,5 ml et permettant une centrifugation de 12 000 x g	12 000 x g ; 1,5 ml	Sans objet
Bain-marie à sec	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Congélateur à -20 °C	Sans objet	Pour conserver l'éluat d'ADN (à long terme)	Sans objet
Réfrigérateur à 2-8 °C	Sans objet	Pour conserver l'éluat d'ADN (à court terme)	Sans objet
Conteneur de déchets	Sans objet	Étanche	Sans objet

## Annexe 4A. Modes opératoires normalisés pour la préparation d'une analyse PCR quantitative en temps réel avec un témoin positif interne (MON4A)

### A4.A1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour préparer une analyse qPCR (amplification en chaîne par polymérase quantitative en temps réel) avec un témoin positif interne aux fins de la détection de *Mycobacterium ulcerans*.

### A4.A2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pratiquant le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A4.A3 Documents connexes

Feuille de travail : Calcul de la composition du mélange de qPCR et plan de plaque.

### A4.A4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes à bords décollés.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées ou dans les lésions ouvertes à bords non décollés.
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

### A4.A5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A4.

### A4.A6 Équipement

Voir la liste fournie dans l'appendice A4.

### A4.A7 Procédure

#### A4.A7.1 Préparation de l'expérience

When the laboratory receives a shipment of samples for confirmation of Buruli ulcer, the samples should be registered and treated that day or the day just using the following procedure.

1. Sur la feuille de travail, consigner le plan de plaque pour chaque nouvelle amplification réalisée avec des échantillons.
2. Compter le nombre d'amplifications à préparer ; il est important de toujours prévoir trois réactions supplémentaires pour disposer d'une quantité suffisante de mélange à la fin de l'expérience.
3. Faire les calculs relatifs à la préparation du mélange de PCR et remplir le tableau.
4. Mettre en marche le thermocycleur et configurer le plan de plaque.

#### A4.A7.2 Préparation du mélange de PCR

Sous une hotte de PCR propre :

1. Porter des gants et une blouse jetable réservés exclusivement à cet espace de travail.
2. Décongeler les réactifs suivants : mélange réactionnel de qPCR, amorces et sonde (IS2404), amorces et sonde CY5 du témoin positif interne, aliquote d'eau stérile.
3. Dilution de la sonde (IS2404) : dilution d'un facteur 10 avant utilisation :
  - centrifuger le tube décongelé ;
  - dans un nouveau tube à bouchon vissé, verser 18 µl d'eau ;
  - ajouter 2 µl de sonde ;
  - agiter lentement au vortex et centrifuger quelques secondes.
4. Dilution des amorces (IS2404) :
  - centrifuger les deux aliquotes des tubes d'amorce ;
  - ajouter 95 µl d'eau directement dans chaque tube ;
  - agiter lentement au vortex et centrifuger quelques secondes.

#### A4.A7.3 Préparation du mélange de PCR

1. Respecter les quantités d'eau, de mélange réactionnel, de sondes et d'amorces calculées dans la feuille de travail.
2. Préparer un nouveau tube à bouchon vissé et mélanger le mélange réactionnel en retournant le tube.
3. Commencer toujours par pipeter l'eau, puis les amorces/sonde (témoin positif interne), les deux amorces et la sonde (IS2404). Finir par l'ajout du mélange réactionnel.
4. Mélanger en retournant le tube et centrifuger quelques secondes.
5. Préparer un portoir avec des barrettes de huit tubes.
6. Transvaser 20 µl de mélange dans chaque tube.
7. Ne pas fermer les tubes.

#### A4.A7.4 Mélange de PCR et échantillons

1. Sur une paillasse réservée à cet effet, placer le portoir contenant les barrettes de tubes pour PCR, les échantillons de patients et le plasmide.
2. Ajouter 5 µl d'échantillons de patients conformément au plan de plaque.
3. Fermer les barrettes de tubes d'échantillons de patients.
4. Préparer la plage standard d'ADN plasmidique dans des tubes à bouchon vissé comme suit :
  - décongeler une aliquote d'un tube de 10 µl contenant 1E8 bact/ml ;
  - ajouter 90 µl d'eau directement dans le tube = premier point de la courbe d'étalonnage = 1E7 bact/ml ;
  - verser 45 µl d'eau dans cinq nouveaux tubes à bouchon vissé ;
  - effectuer une dilution en cascade en pipétant 5 µl du premier tube et en les ajoutant au contenu des tubes de 45 µl : on obtient 1E7 bact/ml, 1E6 bact/ml, 1E5 bact/ml, 1E4 bact/ml, 1E3 bact/ml, 1E2 bact/ml ;
  - ajouter 5 µl d'ADN plasmidique dans les barrettes de tubes conformément au plan de plaque ;
  - fermer les barrettes de tubes.

#### A4.A7.5 Amplification

1. Centrifuger les barrettes et les placer dans le thermocycleur.
2. Exécuter le programme d'amplification.

#### A4.A7.6 Analyse des résultats de PCR

1. Contrôler les deux témoins négatifs : extraction et préparation du mélange.
2. Examiner la courbe d'étalonnage pour vérifier que les valeurs de Ct et R2 sont correctes.
3. Contrôler le témoin positif (IPC Diagenode CY5) :  $27 < Ct < 35$ .
4. Vérifier la limite de détection pour les sujets humains :  $< 35$  cycles.
5. Calculer le nombre de bacilles/ml pour les échantillons positifs.
6. Consigner les résultats dans le registre manuel et dans la feuille de travail à l'usage du clinicien.
7. Communiquer les résultats conformément aux procédures de validation en vigueur dans votre pays (email, WhatsApp, etc.).

#### A4.A8 Contrôle interne de la qualité

Témoin positif interne.

#### A4.A9 Mesures de sécurité

Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et doivent être jetés de manière appropriée.

#### A4.A10 Références bibliographiques

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

#### A4.A11 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

## Annexe 4B. Modes opératoires normalisés pour la préparation d'une analyse PCR en temps réel sans témoin positif interne (MON4B)

### A4.B1 Objet

Décrire la procédure recommandée pour préparer une analyse qPCR (amplification en chaîne par polymérase en temps réel) sans témoin positif interne aux fins de l'identification de *Mycobacterium ulcerans*.

### A4.B2 Champ d'application

Ces modes opératoires normalisés doivent être appliqués par tous les membres du réseau de laboratoires pour l'ulcère de Buruli (BU-LABNET) pratiquant le diagnostic par PCR de l'ulcère de Buruli.

### A4.B3 Documents connexes

Feuille de travail : Calcul de la composition du mélange de qPCR et plan de plaque.

### A4.B4 Types d'échantillons

- Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions ouvertes.
- Aspiration à l'aiguille fine pour le prélèvement d'échantillons dans les lésions fermées.
- **La biopsie n'est pas recommandée pour la confirmation en laboratoire des cas d'ulcère de Buruli.**

### A4.B5 Réactifs et produits renouvelables

Voir la liste fournie dans l'appendice A4.

### A4.B6 Équipement

Voir la liste fournie dans l'appendice A4.

### A4.B7 Procédure

#### A4.B7.1 Préparation de l'expérience

1. Sur la feuille de travail, consigner le plan de plaque pour chaque nouvelle amplification réalisée avec des échantillons.
2. Compter le nombre d'amplifications à préparer. Il est important de toujours prévoir trois réactions supplémentaires pour disposer d'une quantité suffisante de mélange à la fin de l'expérience.
3. Faire les calculs relatifs à la préparation du mélange de PCR et remplir le tableau.
4. Mettre en marche le thermocycleur et configurer le plan de plaque.

#### A4.B7.2 Préparation du mélange de PCR

Sous une hotte de PCR propre :

1. Porter des gants et une blouse jetable réservés exclusivement à cet espace de travail.
2. Décongeler les réactifs suivants :
  - a. qPCR master-mix/primers and probe/an aliquot of sterile water
3. Dilution de la sonde : dilution d'un facteur 10 avant utilisation
  - a. centrifuger le tube décongelé ;
  - b. dans un nouveau tube à bouchon vissé, verser 18 µl d'eau ;
  - c. ajouter 2 µl de sonde ;
  - d. agiter lentement au vortex et centrifuger quelques secondes.
4. Dilution des amorces :
  - a. centrifuger les deux aliquotes des tubes d'amorce ;
  - b. ajouter 95 µl d'eau directement dans chaque tube ;
  - c. agiter lentement au vortex et centrifuger quelques secondes.

#### *A4.B7.3 Préparation du mélange de PCR*

1. Respecter les quantités d'eau, de mélange réactionnel, de sonde et d'amorces calculées dans la feuille de travail.
2. Préparer un nouveau tube à bouchon vissé et mélanger le mélange réactionnel en retournant le tube.
3. Commencer toujours par pipeter l'eau, puis les deux amorces et la sonde ; finir par l'ajout du mélange réactionnel.
4. Mélanger en retournant le tube et centrifuger quelques secondes.
5. Préparer un portoir avec des barrettes de huit tubes.
6. Transvaser 20 µl de mélange dans chaque tube.
7. Ne pas fermer les tubes.

#### *A4A.B7.4 Mélange de PCR et échantillons*

1. Sur une paillasse réservée à cet effet, placer le portoir contenant les barrettes de tubes pour PCR, les échantillons de patients et le plasmide.
2. Ajouter 5 µl d'échantillons de patients conformément au plan de plaque.
3. Fermer les barrettes de tubes d'échantillons de patients.
4. Préparer la plage standard d'ADN plasmidique dans des tubes à bouchon vissé :
  - a. décongeler une aliquote d'un tube de 10 µl contenant 1E8 bact/ml ;
  - b. ajouter 90 µl d'eau directement dans le tube = premier point de la courbe d'étalonnage = 1E7 bact/ml ;
  - c. verser 45 µl d'eau dans cinq nouveaux tubes à bouchon vissé ;
  - d. effectuer une dilution en cascade en pipétant 5 µl du premier tube et en les ajoutant au contenu des tubes de 45 µl : on obtient 1E7 bact/ml, 1E6 bact/ml, 1E5 bact/ml, 1E4 bact/ml, 1E3 bact/ml, 1E2 bact/ml ;
  - e. ajouter 5 µl d'ADN plasmidique dans les barrettes de tubes conformément au plan de plaque ;
  - f. fermer les barrettes de tubes.

#### *A4.B7.5 Amplification*

1. Centrifuger les barrettes et les placer dans le thermocycleur.
2. Exécuter le programme d'amplification.

#### *A4.B7.6 Analyse des résultats de PCR*

1. Contrôler les deux témoins négatifs : extraction et préparation du mélange.
2. Examiner la courbe d'étalonnage pour vérifier que les valeurs de Ct et R2 sont correctes.
3. Vérifier la limite de détection pour les sujets humains : <35 cycles.
4. Calculer le nombre de bacilles/ml pour les échantillons positifs.
5. Consigner les résultats dans le registre manuel et dans la feuille de travail à l'usage du clinicien.
6. Communiquer les résultats conformément aux procédures de validation en vigueur dans votre pays (email, WhatsApp, etc.).

**A4.B8 Contrôle interne de la qualité**

Pas de témoin positif interne.

**A4.B9 Mesures de sécurité**

Tous les matériels usagés doivent systématiquement être considérés comme infectieux et doivent être jetés de manière appropriée.

**A4.B10 Références bibliographiques**

Portaels F (éditeur). Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2014 ([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702\\_fre.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111739/9789242505702_fre.pdf), consulté en mai 2020).

**A4.B11 Liste du personnel ayant lu et compris le présent document**

Nom du membre du personnel	Date (jj/mm/aa)	Signature

Appendice A4. Liste de matériels et réactifs pour l'analyse PCR en temps réel sans témoin positif interne

Nom	Référence	Observations	Photos
Calcul de la composition du mélange de qPCR et plan de plaque	(BU-FRM-01, version 1.0)	Fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Mélange réactionnel de qPCR	HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (p. ex. Solis BioDyne, nouveau mélange candidat de Dutscher)	Fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Amorces et sondes	De nouvelles amorces et sondes seront utilisées ; fournies par le BU-LABNET	Fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Plasmide IS2404	(IS2404) n° 30-8606-01 (GenExpress)	Fourni par le BU-LABNET	Sans objet
Eau stérile	Sans objet	Sans objet	Sans objet
Barrettes de 8 tubes avec bouchons	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Microtube de 1,5 ml avec bouchon à vis	Par exemple : 39289 (Dutscher)	Vérifier que le bouchon est attaché au tube	
Agitateur vortex	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	
Pipettes	Sans objet	Matériel actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Pointes à filtre	Seront fournies par BU-LABNET en fonction des informations communiquées par les laboratoires concernant les pipettes	Les laboratoires conserveront les pipettes actuellement utilisées	Sans objet
Gants	Sans objet	Non poudrés	Sans objet
Blouses de laboratoire jetables	Sans objet	Pleine longueur, à manches longues	Sans objet
Appareil de qPCR	Sans objet	Appareil de qPCR actuellement utilisé dans les laboratoires respectifs	Sans objet
Conteneur de déchets	Sans objet	Étanche	Sans objet



9789240016118



9 789240 016118