

information
formation
recherche
coopération internationale

Techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic du SRAS

Hugues Charest, Ph.D.
Laboratoire de santé publique du Québec
Programme de biologie moléculaire

12 et 17 décembre 2003

Institut national de santé publique
Québec

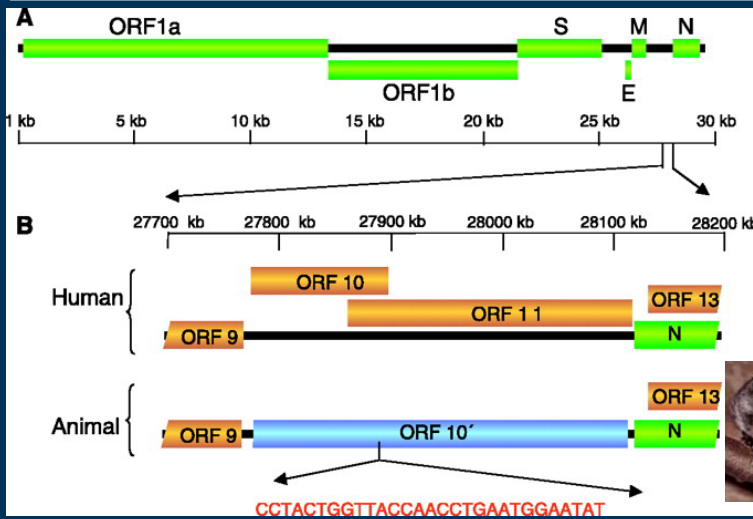
Recherche du SRAS CoV par RT-PCR

- 1) Techniques PCR/détection
- 2) Séquences cibles et amorces pour la recherche du *Coronavirus* associé au SRAS (SRAS CoV)
- 3) Types d'échantillons
- 4) Pratiques et précautions en laboratoire

2 formation

Institut national de santé publique
Québec

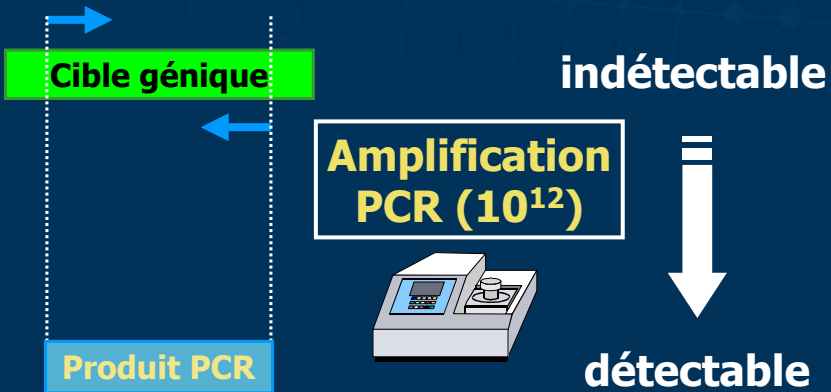
Génome du SRAS CoV



3

Guan et al., Science

Amplification par PCR

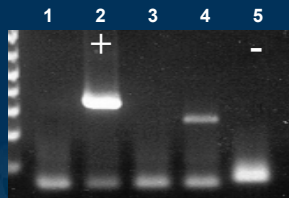


4

Détection de produits PCR

1) Conventiennelle, par électrophorèse en gel d'agarose

- Visualisation directe par coloration des produits de la PCR sur gel (bromure d'éthidium)
- Distance de migration sur gel définit la spécificité
- Qualitative/semi-quantitative(dilutions/calibrateur).



5

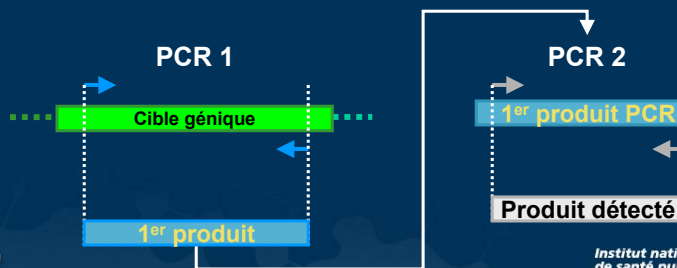


Institut national
de santé publique
Québec

Détection de produits PCR

2) « Nested PCR », avec détection conventionnelle par électrophorèse en gel d'agarose

- Sensibilité et spécificité accrues
- Sujette à la contamination
- Strictement qualitative



6



Institut national
de santé publique
Québec

Détection de produits PCR

3) Détection de produits PCR par colorimétrie ou immunofluorescence, utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique conjuguée

- Grande capacité de multiplex
- qualitative/semi-quantitative (dilutions/calibrateur)



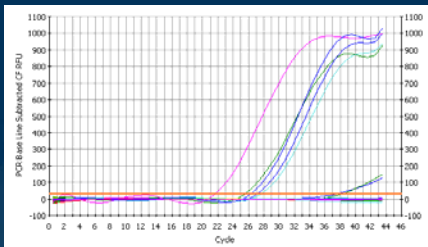
7



Détection de produits PCR

4) Détection de produits PCR en temps réel

- Utilisant une coloration non spécifique de l'ADN (SYBR green). Une analyse de la température de dissociation du produit PCR définit la spécificité
- Utilisant une ou des sondes marquées avec des fluorochromes (Taqman, FRET, beacons...)
- Semi-quantitative/quantitative (avec calibrateur)



8



Appareils PCR avec détection en temps réel



Adapté aux grands volumes



Plus rapide



9

Institut national
de santé publique
Québec

Analyses SRAS au LSPQ



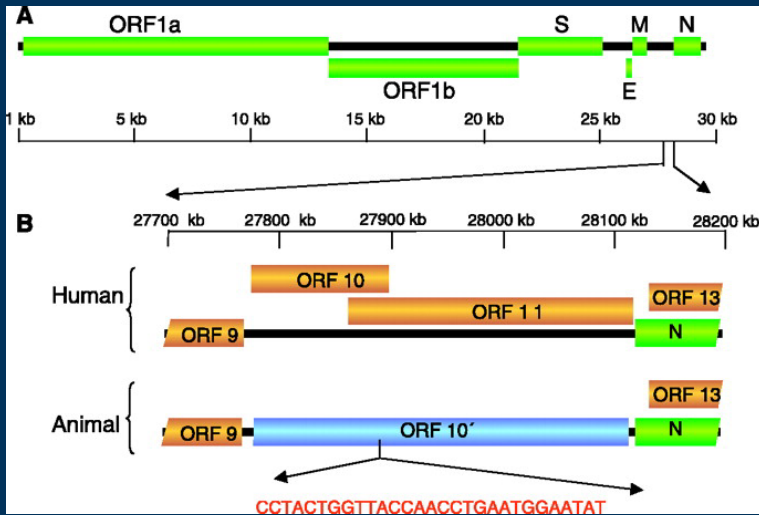
- **Début avril:** Premiers RT-PCR pour la recherche du hMPV et du *Coronavirus* humain
- **Mi-avril:** Séquences pour le SRAS CoV disponibles
- **28 avril:** Réception de SNPs SRAS CoV+ envoyées de Toronto par le CPHL
- **29 avril 2003:** Premiers RT-PCR diagnostiques pour le SRAS CoV
- **Début juin:** Le LNM envoie des lysats de culture dénaturés aux provinces pour CTL+ SRAS CoV

10



Institut national
de santé publique
Québec

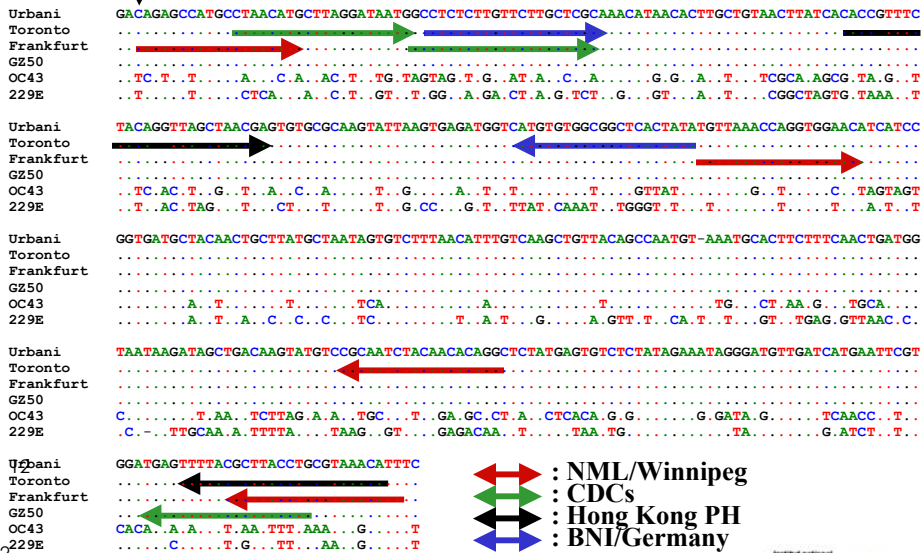
Génom du SRAS CoV



Guan et al., Science

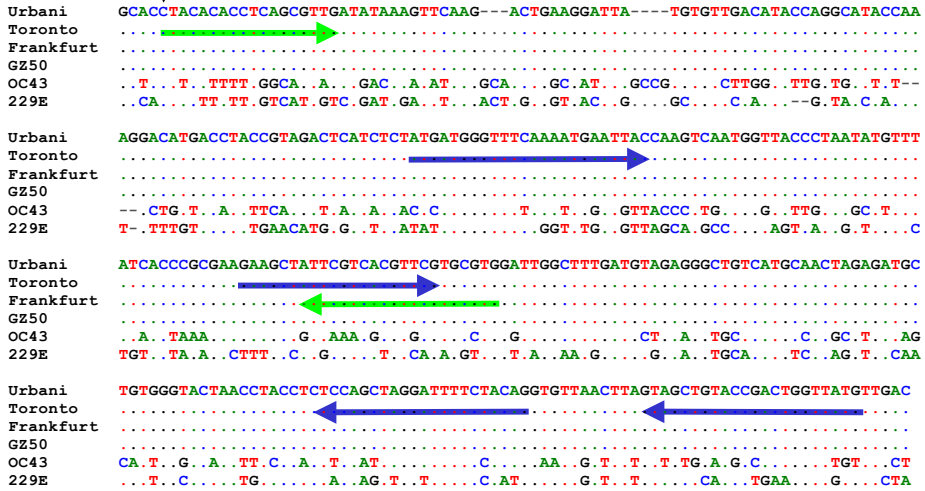
Amorces spécifiques pour le SRAS CoV

15224



Amorces spécifiques pour le SRAS CoV

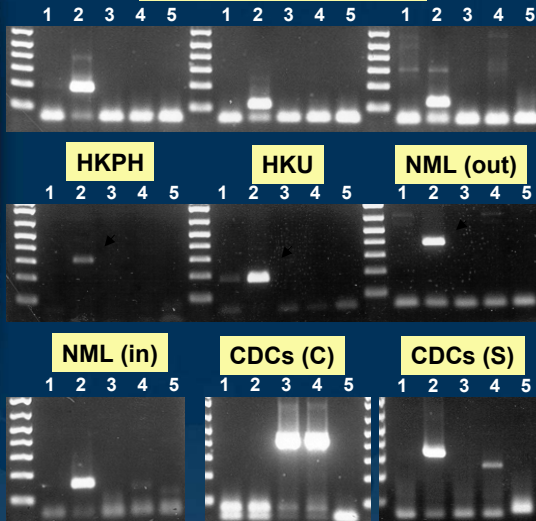
18026



13

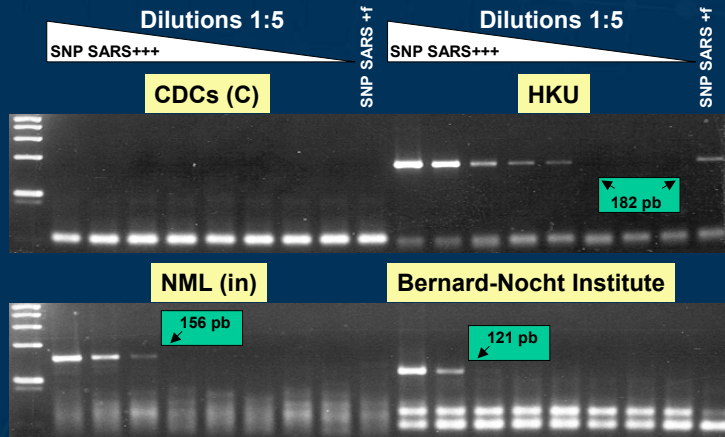
Spécificité des amorces (avril 2003)

Bernard-Nocht Institute



14

Sensibilité des amorces (avril 2003)



15



Institut national
de santé publique
Québec

Spécimens cliniques pour la recherche du SRAS CoV par RT-PCR

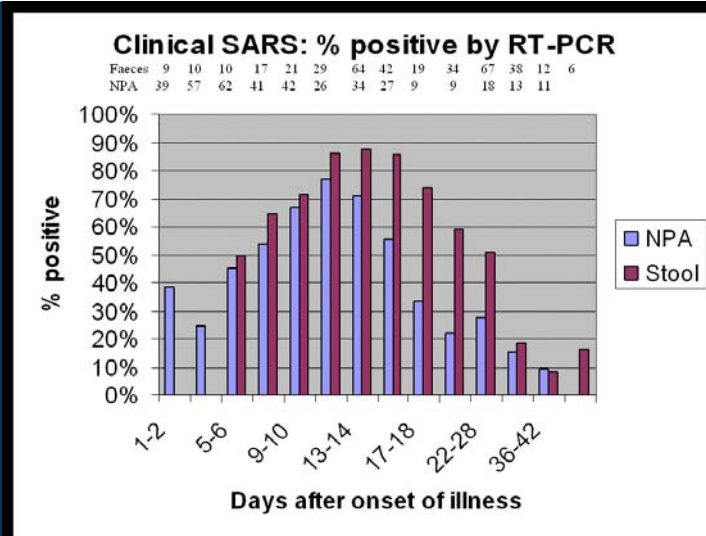
- 1) Écouvillonnage ou aspirations naso-pharyngés, dans un milieu de transport pour la virologie (MTV)
- 2) Lavage broncho-alvéolaire et aspiration trachéale
- 3) Sérum/plasma (pas d'héparine)
- 4) Selle non fixée, écouvillonnage rectal (MTV)
- 5) Tissu/biopsie non fixés

16



Institut national
de santé publique
Québec

Spécimens cliniques pour la recherche du SRAS CoV par RT-PCR



Peiris *et al.* (source: CDCs)

Spécimens cliniques pour la recherche du SRAS CoV par RT-PCR

- Préparation de portions aliquotes pour les épreuves de confirmation
- Lyse et dénaturation rapide des spécimens à l'aide d'agents chaotropiques, afin de:
 - Conserver l'intégrité de l'ARN génomique dans les spécimens
 - Inactiver le virus

Amplifications par RT-PCR pour la détection du SRAS CoV

1) Trousses commerciales

- **Artus et Artus/Abbott (RealArt™ HPA-Coronavirus RT PCR Reagents assay);** réactifs RT-PCR, détection sur LightCycler ou ABI 7000
- **Prodesse SARS/CORONAPLEX™;** inclut les réactifs d'extraction, détection colorimétrique
- **Amplitect™;** réactifs RT-PCR, détection en temps réel sur plusieurs plateformes
- **Novitec® SARS PCR kit;** réactifs RT-PCR, détection sur gel
- **Roche LightCycler SARS-CoV Quantification kit;** réactifs RT-PCR, détection en temps réel (FRET)

19



Institut national
de santé publique
Québec

Amplifications par RT-PCR pour la détection du SRAS CoV

2) Trousses « maisons »

- **Multitude réactifs génériques disponibles**
- **Contrôles positifs et négatifs**
 - **Pour les étapes d'extraction**
 - **Pour les étapes d'amplification**
- **La sensibilité et la spécificité d'une épreuve sont relatives aux paramètres techniques utilisés pour son développement**
 - **Paramètres de cyclage**
 - **Réactifs/concentrations**
 - **Méthodes de détection**

20



Institut national
de santé publique
Québec

Épreuves RT-PCR pour la détection du SRAS CoV

Séquences/contrôles;

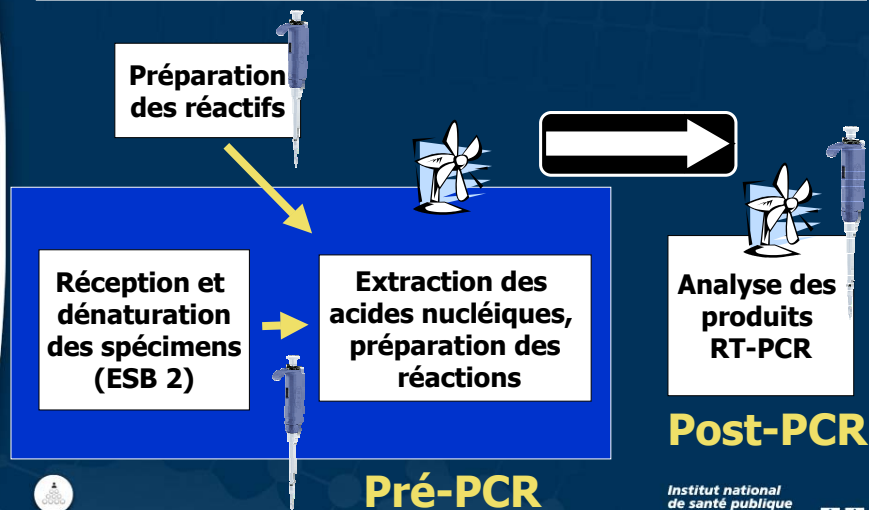
- 1) Amorces disponibles sur le site de l'OMS
www.who.int/csr/sars/primers/en/
- 2) Armored RNA® SARS (Ambion/BNI)
- 3) Séquences complètes du SRAS CoV:
www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/SARS
<http://athena.bioc.uvic.ca/sars>

21



Institut national
de santé publique
Québec

Épreuves diagnostiques par PCR; Pratiques et précautions en laboratoire



22



Institut national
de santé publique
Québec

En situation de pré-alerte

Un résultat est positif si:

- 1) Deux réactions RT-PCR, ciblant deux régions distinctes du génome sont positives
- 2) Des réactions RT-PCR sont positives pour deux prélèvements différents, ou pour deux portions aliquotes du même spécimen
- 3) Les résultats sont confirmés par un deuxième laboratoire

23



Institut national
de santé publique
Québec

Résumé - Détection du SRAS CoV par RT-PCR

- 1) Détection conventionnelle vs en temps réel
 - sensibilité relativement similaire (10 – 50 copies/réaction)
 - **la nested PCR n'est pas recommandée**
 - spécificité relativement similaire
 - les méthodes avec détection en temps réel sont plus rapides
- 2) La quantification stricte n'est pas nécessaire pour le diagnostic

24



Institut national
de santé publique
Québec

Résumé - Détection du SRAS CoV par RT-PCR

3) Contamination/précautions de laboratoire

- **Net avantage de la détection en temps réel**

4) Les trousse commerciales de diagnostic SRAS sont:

- **Coûteuses**
- **Relativement faciles à utiliser**
- **Incluent des échantillons contrôles**

5) Un résultat négatif n'infirmes pas un cas de SRAS

6) Un résultat positif doit être confirmé par un deuxième laboratoire