

Matériel de départ : Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard (vendu par la compagnie BioRad)

EDX SARS-CoV-2 Standard Summary	
Catalog Number	COV019
Analytes	SARS-CoV-2 RNA Transcripts: Envelope (E) Gene (200,000 cp/mL) Nucleocapsid (N) Gene (200,000 cp/mL) Spike Protein (S) Gene (200,000 cp/mL)
Concentration of Human gDNA	75,000 cp/mL
Matrix	Synthetic Matrix, including Human Genomic DNA (gDNA)
Preservative	Sodium Azide
Storage	-20°C or Below
Fill Volume	0.3 mL
Number of Vials Per Kit	5 Vials
Number of Uses	Single Use
Shelf Life	12 Months from Date of Manufacture
Precautions	Biological Risks
Regulatory Status	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Définition de LOD utilisée : La limite de détection correspond au plus petit nombre d'unités génome (de copies) générant un résultat positif (une amplification) au seuil de 90 %. Dix répliques de chaque concentration seront utilisés.

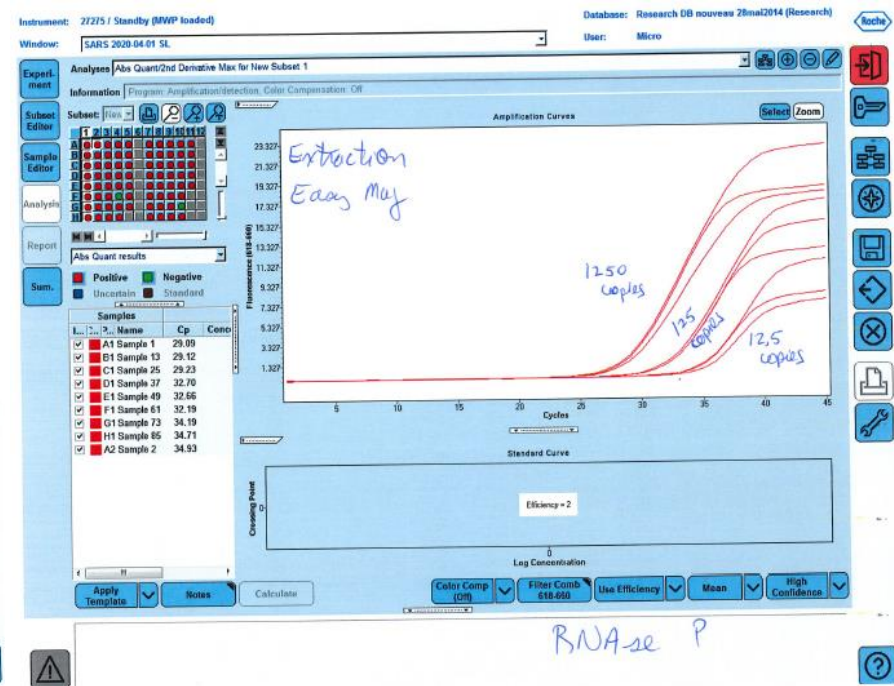
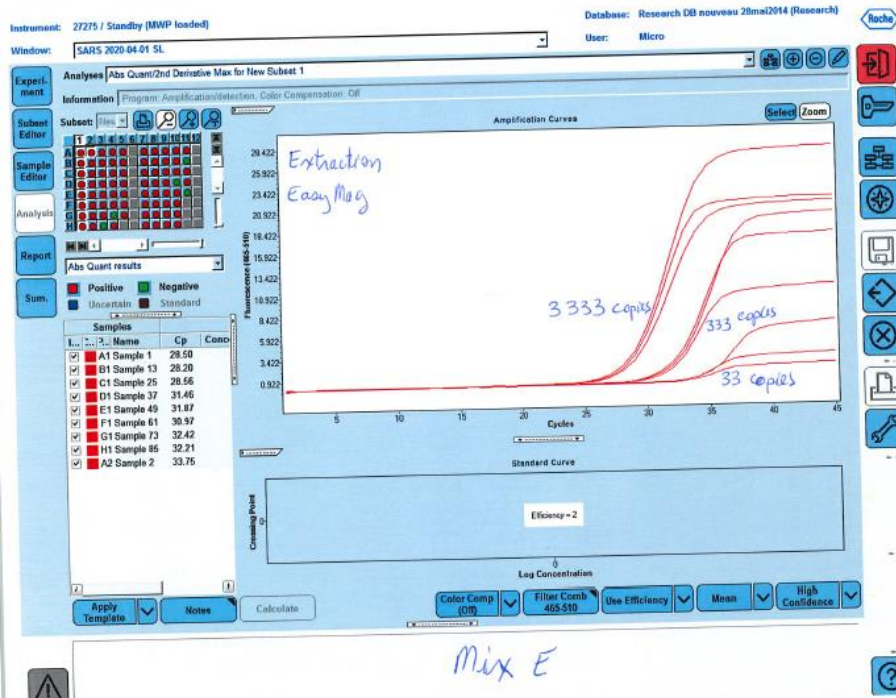
Concentrations analysées :

Avec Extraction

EasyMag (bioMérieux)

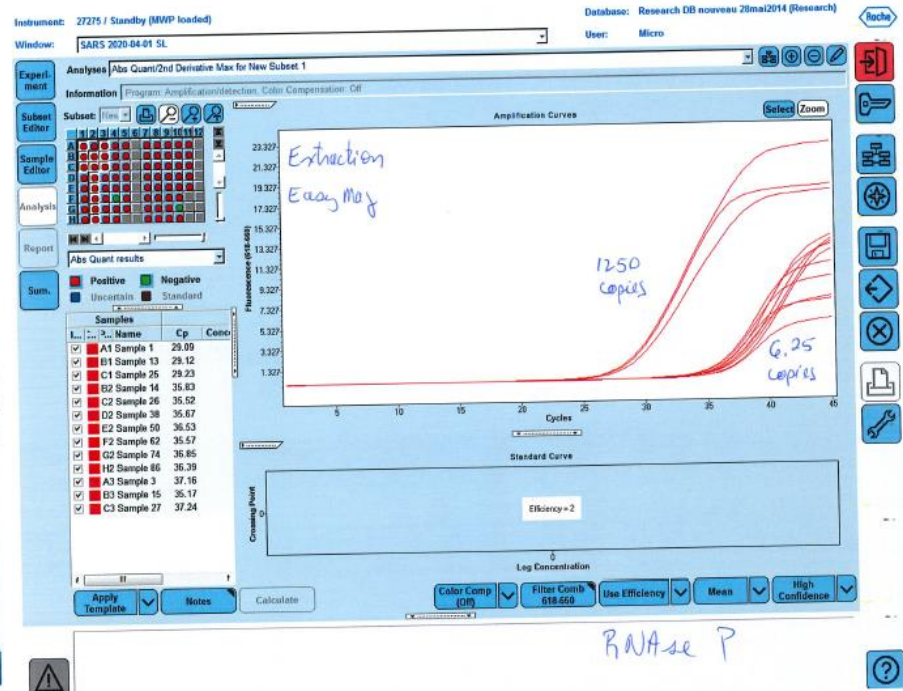
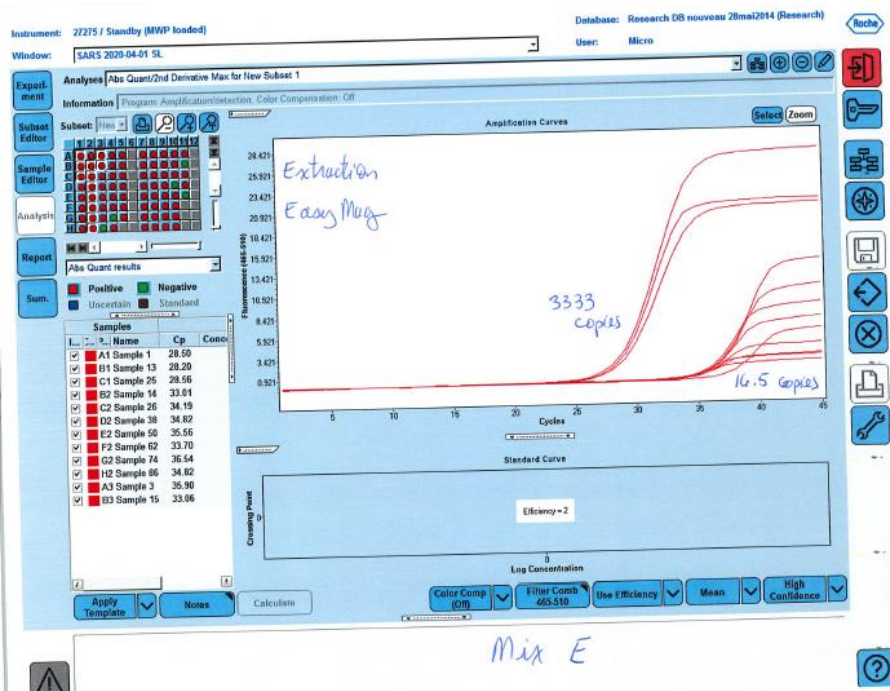
200 µl Standard, 60 µl élution

Solution	Dilution	Gène (E) enveloppe		Human gDNA	
		Concentration	Quantité dans la réaction PCR	Concentration	Quantité dans la réaction PCR
Extraction		40 000 copies/60 µl		15 000 copies/60 µl	
Pur		666,6 copies/µl	3 333 copies/PCR	250 copies/µl	1250 copies/PCR
Solution A	1/10	66,6 copies/µl	333 copies/PCR	25 copies/µl	125 copies/PCR
Solution B	1/100	6,6 copies/µl	33 copies/PCR	2,5 copies/µl	12,5 copies/PCR
Solution C	1/200	3,3 copies/µl	16,5 copies/PCR	1,25 copie/µl	6,25 copies/PCR
Solution D	1/400	1,65 copie/µl	8,25 copies/PCR	0,625 copie/µl	3,125 copies/PCR
Solution E	1/800	0,825 copie/µl	4,125 copies/PCR	0,313 copie/µl	1,56 copie/PCR

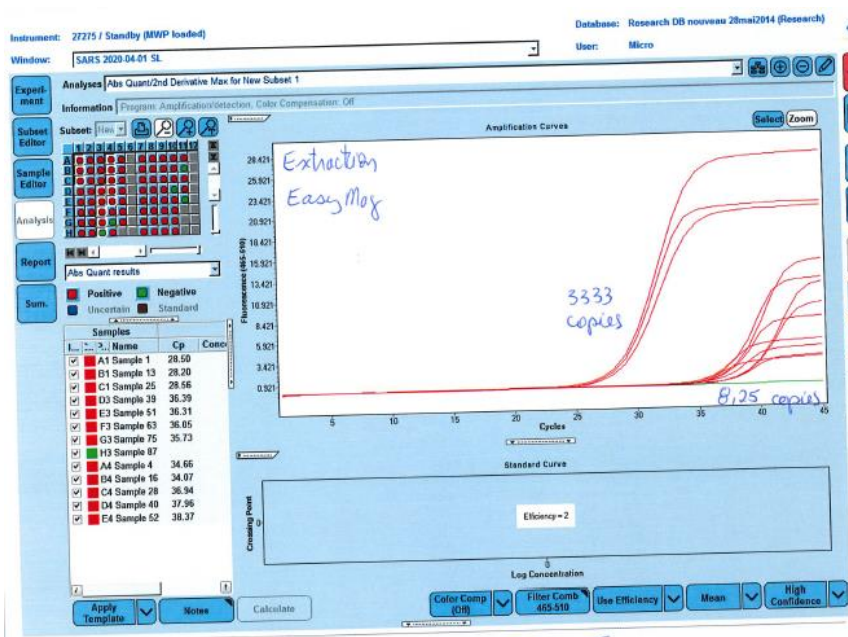


Extraction EasyMag	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Pur	28,5	28,00			29,09	22,98		
3333 copies gène E	28,2	22,00			29,12	18,87		
1250 copies RNAseP	28,56	21,47	28,42	23,82	29,23	18,32	29,15	20,06
Solution A (1/10)	31,46	17,76			32,7	15,45		
333 copies gène E	31,87	20,13			32,66	17,57		
125 copies RNAseP	30,97	11,59	31,43	16,49	32,19	12,73	32,52	15,25
Solution B (1/100)	32,42	3,48			34,19	8,34		
33 copies gène E	32,21	2,25			34,71	7,58		
12,5 copies RNAseP	33,75	7,28	32,79	4,33	34,93	11,62	34,61	9,18

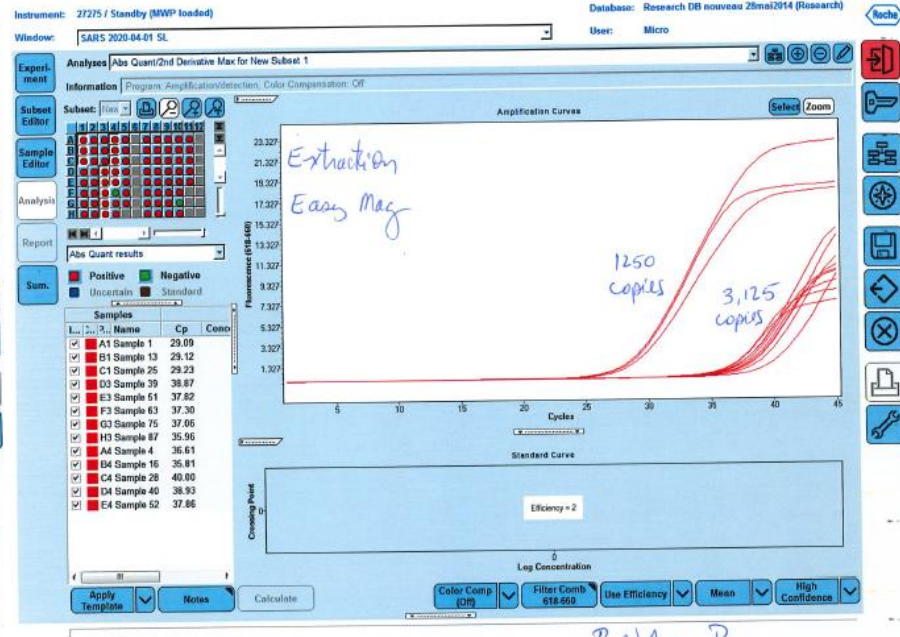
Note : Je ne sais pas pourquoi la fluorescence des courbes pour la dilution 1/100 (solution B) est si basse pour le gène E, la fluorescence remonte pour les dilutions suivantes.



Extraction EasyMag	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution C (1/200) 16,5 copies gène E 6,25 copies RNAseP	33,01	3,05			35,83	5,75		
	34,19	4,45			35,52	9,89		
	34,82	7,70			35,67	11,24		
	35,56	11,58			36,53	13,87		
	33,7	3,20			35,57	7,88		
	36,54	6,25			36,85	13,17		
	34,82	9,44			36,39	13,01		
	35,9	14,61			37,16	13,50		
	33,06	2,41			35,17	7,65		
35,26	9,71			37,24	12,50			
			34,69	7,24			36,19	10,85

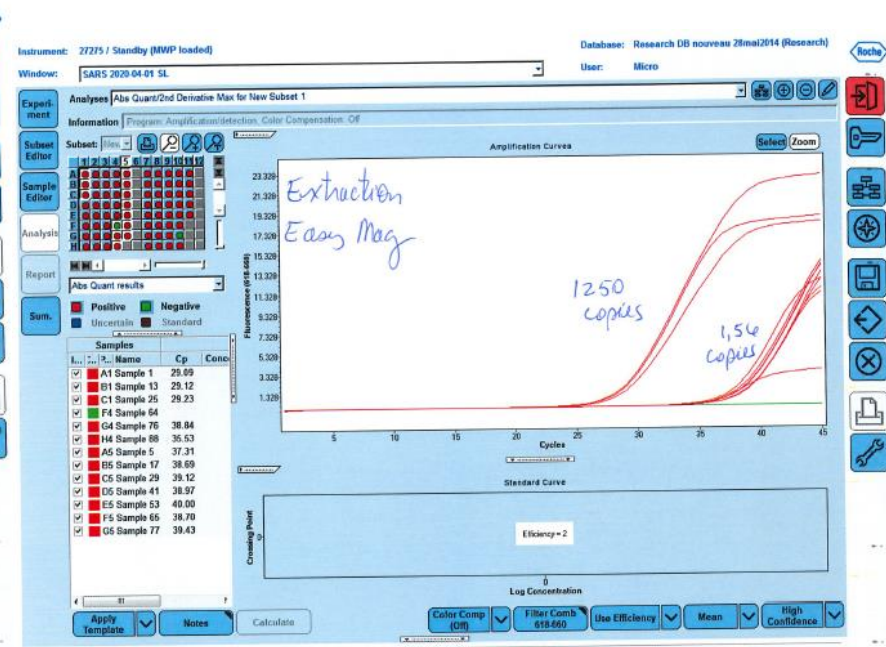
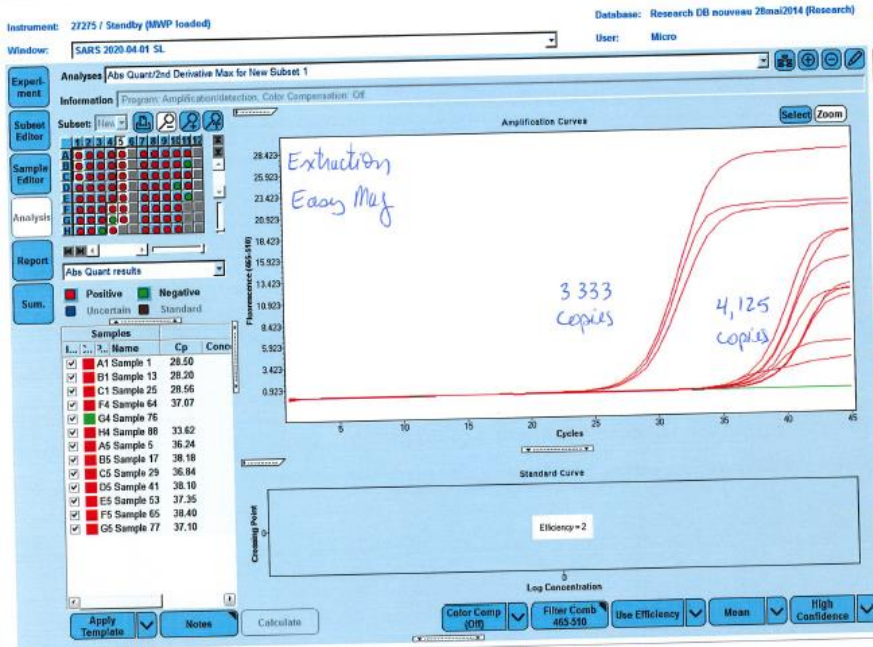


Mix E



RNase P

Extraction EasyMag	Cible E		Moyenne		RNaseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution D (1/400)	36,39	12,85	36,28	8,33	38,87	11,65	37,62	10,69
	36,31	3,53			37,82	10,86		
	36,05	8,17			37,3	10,31		
	35,73	4,60			37,06	10,42		
8,25 copies gène E	Negatif				35,96	8,45		
	34,66	5,42			36,61	9,40		
3,125 copies RNaseP	34,07	3,33			35,81	7,47		
	36,94	15,04			40	10,06		
	37,96	9,80			38,93	13,80		
	38,37	12,25			37,86	14,48		



Mix E

RNAse P

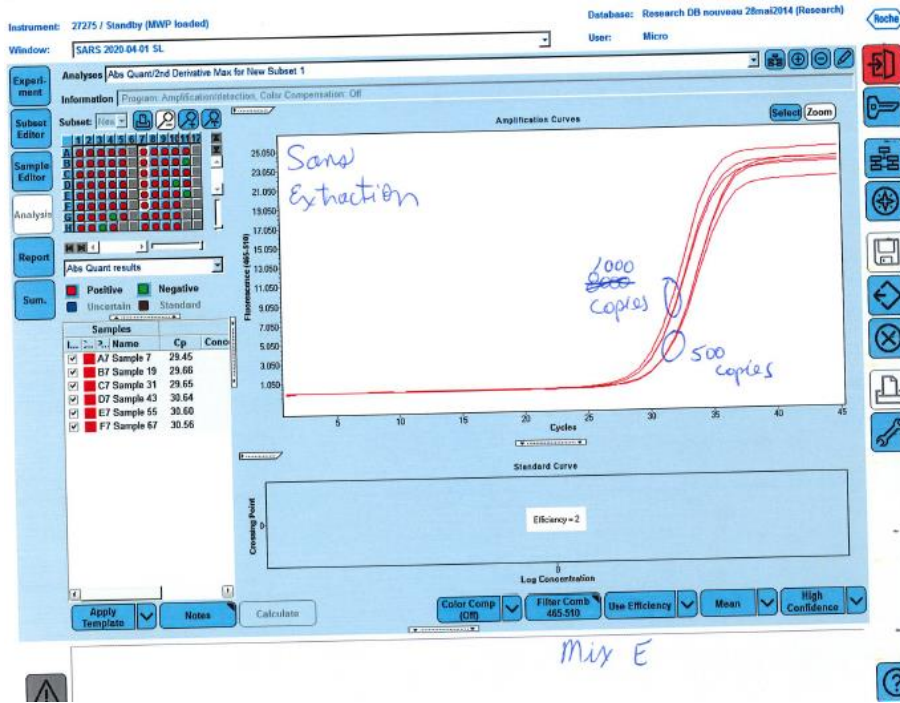
Extraction EasyMag	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution E (1/800)	37,07	15,25	36,99	12,00	Négatif		38,51	11,99
	Négatif				38,84	11,78		
4,125 copies gène E	33,62	3,71			35,53	3,60		
	36,24	5,61			37,31	12,57		
	38,18	11,77			38,69	11,32		
1,56 copie RNAseP	36,84	18,53			39,12	14,11		
	38,1	10,92			38,97	14,00		
	37,35	18,41			40	13,35		
	38,4	12,23			38,7	14,46		
	37,1	11,61						

Sans Extraction

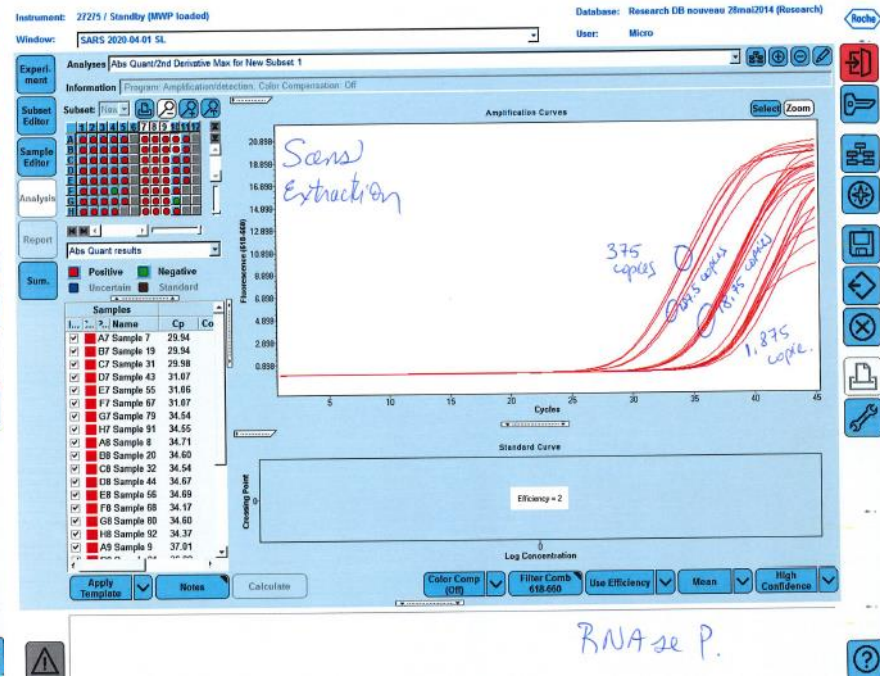
Lyse thermique

40 µl Standard

Solution	Dilution	Gène (E) enveloppe		Human gDNA	
		Concentration	Quantité dans la réaction PCR	Concentration	Quantité dans la réaction PCR
Pur		200 copies/µl	1000 copies/PCR	75 copies/µl	375 copies/PCR
Solution A	1/2	100 copies/µl	500 copies/PCR	37,5 copies/µl	187,5 copies/PCR
Solution B	1/20	10 copies/µl	50 copies/PCR	3,75 copies/µl	18,75 copies/PCR
Solution C	1/200	1 copie/µl	5 copies/PCR	0,375 copie/µl	1,875 copie/PCR
Solution D	1/400	0,5 copie/µl	2,5 copies/PCR	0,188 copie/µl	0,94 copie/PCR

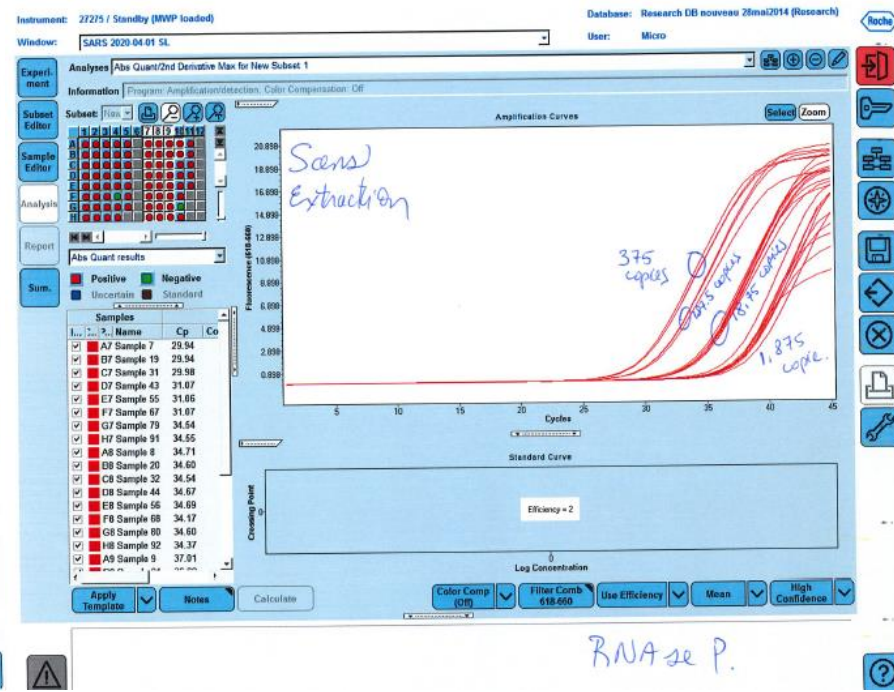
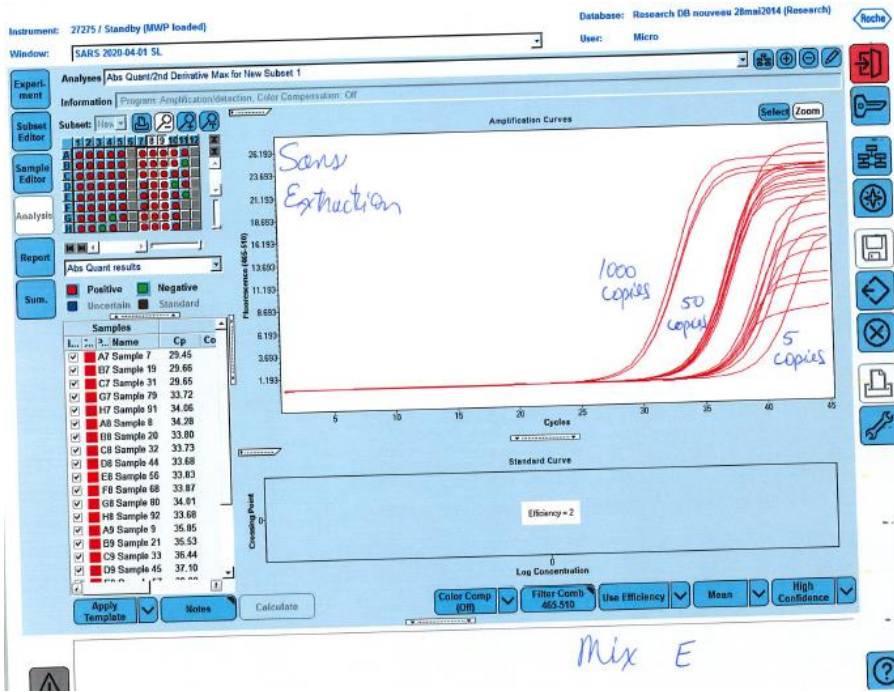


Mix E

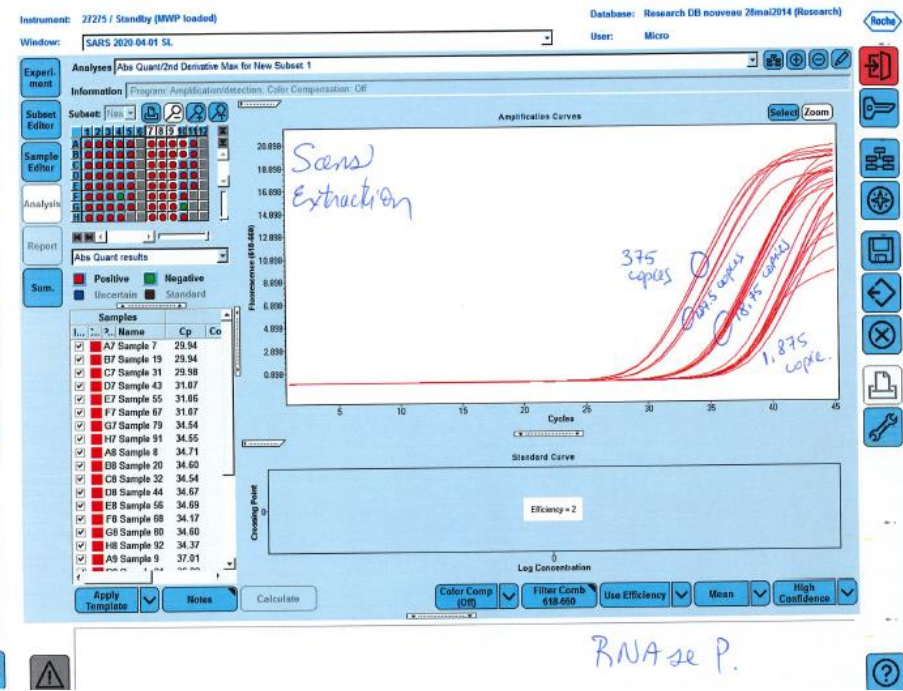
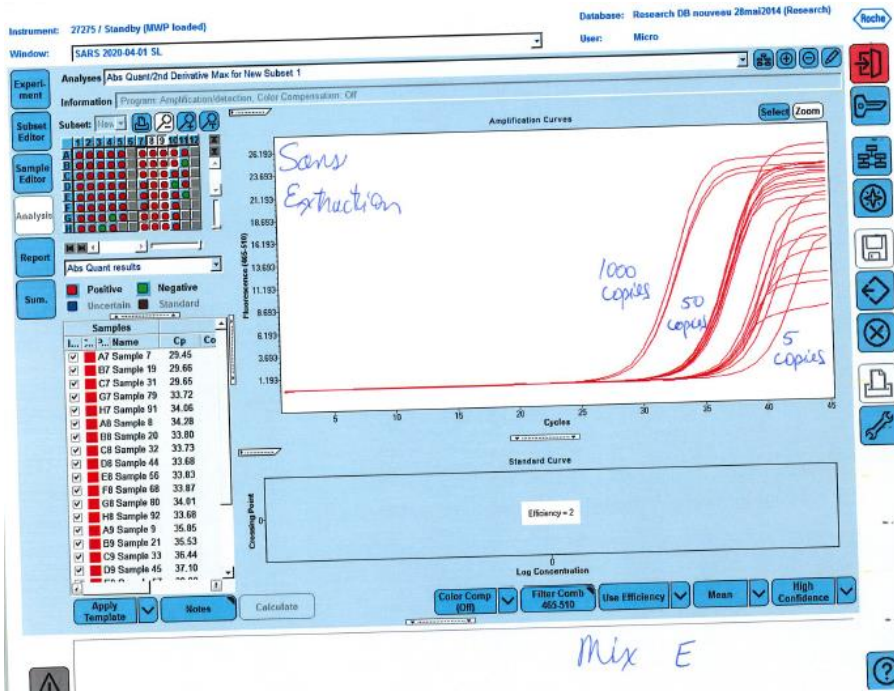


RNAse P.

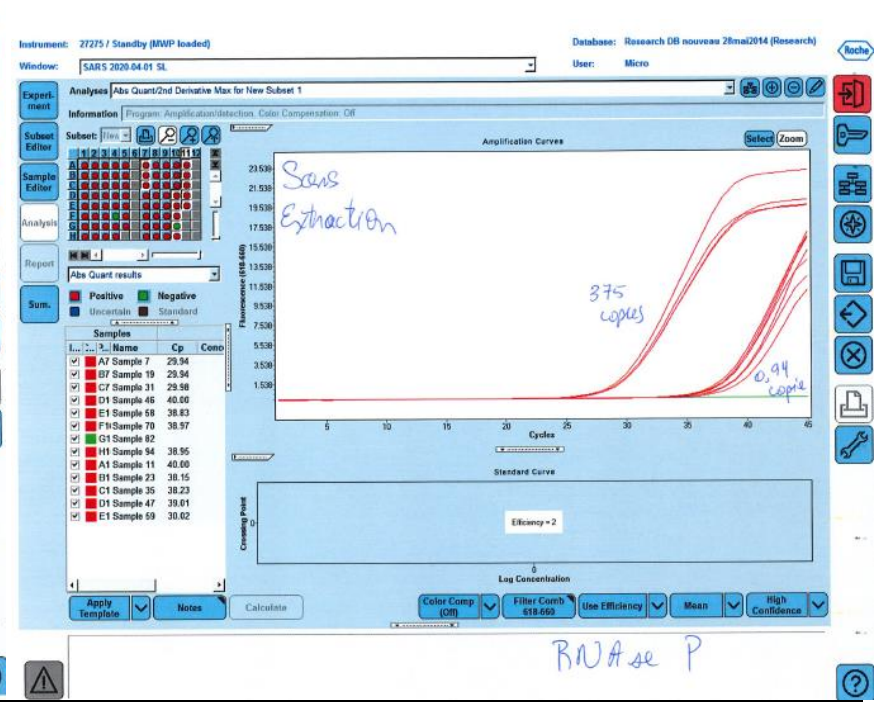
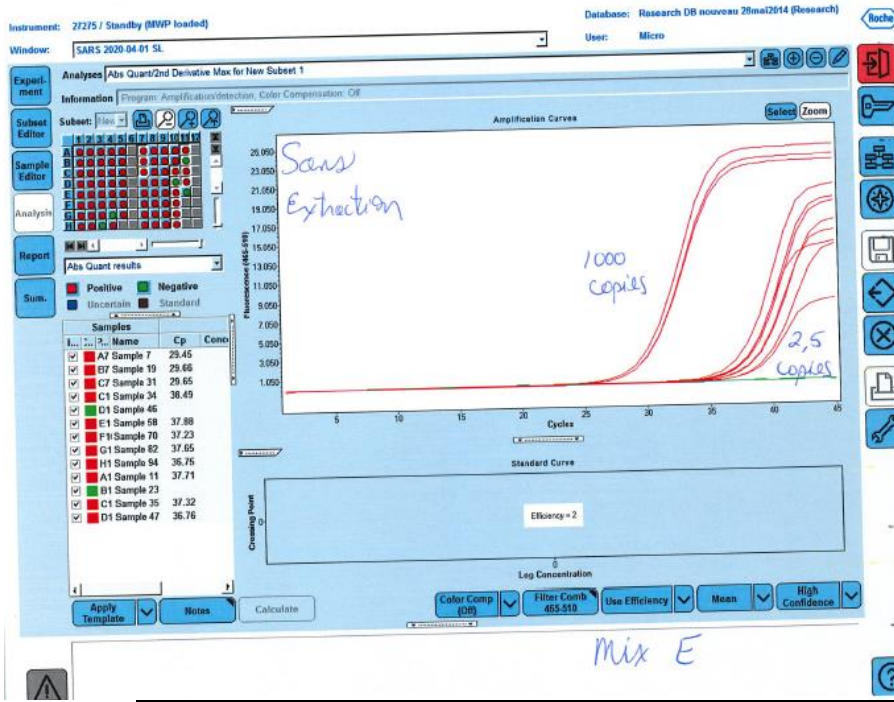
Lye thermique	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Pur	29,45	24,65			29,94	19,59		
1000 copies gène E	29,66	23,72			29,94	19,66		
375 copies RNAseP	29,65	23,14	29,59	23,84	29,98	20,18	29,95	19,81
Solution A (1/2)	30,64	23,72			31,07	20,59		
500 copies gène E	30,6	23,39			31,06	20,04		
187,5 copies RNAseP	30,56	21,64	30,60	22,91	31,07	18,22	31,07	19,62



Lyse thermique	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution B (1/20) 50 copies gène E 18,75 copies RNAseP	33,72	21,61	33,87	22,64	34,54	17,35	34,54	18,34
	34,06	21,11			34,55	16,94		
	34,28	25,81			34,71	19,96		
	33,8	21,85			34,6	18,45		
	33,73	23,28			34,54	18,42		
	33,68	23,64			34,67	19,16		
	33,83	20,08			34,69	17,56		
	33,87	22,55			34,17	18,65		
	34,01	22,83			34,6	18,24		
	33,68	23,61			34,37	18,63		



Lyse thermique	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution C (1/200) 5 copies gène E 1,875 copie RNAseP	35,85	11,65	36,50	15,04	37,01	11,64	37,35	14,28
	35,53	10,68			36,82	12,78		
	36,44	14,19			36,9	17,11		
	37,1	20,48			37,61	16,37		
	39,2	15,63			38,1	16,35		
	36,52	18,01			37,29	14,55		
	37,2	16,50			38,51	14,60		
	34,95	8,02			36,18	9,62		
	36,04	15,67			37,28	13,66		
	36,12	19,58			37,77	16,14		



Lyse thermique	Cible E		Moyenne		RNAseP		Moyenne	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
Solution D (1/400) 2,5 copies gène E 0,94 copie RNAseP	38,49	14,28	37,47	16,06	38,3	14,12	38,94	14,77
	Négatif				40	15,05		
	37,88	16,83			38,83	16,89		
	37,23	19,17			38,97	16,37		
	37,65	15,72			Négatif			
	36,75	14,54			38,95	12,44		
	37,71	8,63			40	11,01		
	Négatif				38,15	14,09		
	37,32	18,79			38,23	16,47		
	36,76	20,54			39,01	16,46		

Conclusions :

- La limite de détection de l'essai RT-PCR SARS-CoV-2 est de 5 copies de virus par PCR, avec un cut off à 37 de valeur de Ct. Ceci représente une limite de détection de 300 copies de virus / ml d'échantillon primaire, considérant un rendement théorique de l'extraction d'acides nucléiques à 100%.
- La détection du gène de la RNase P humain en multiplex avec le gène E fonctionne bien, avec une limite de détection similaire pour le même cut off.
- Pour l'essai sans extraction, la limite de détection de l'essai RT-PCR SARS-CoV-2 est de 5 copies de virus par PCR, avec un cut off à 37 de valeur de Ct. Ceci représente une limite de détection de 2000 copies de virus / ml d'échantillon primaire.
- La détection du gène de la RNase P humain en multiplex avec le gène E fonctionne bien également pour le protocole sans extraction, avec une limite de détection similaire pour le même cut off.

2020-04-02

Simon Lévesque

Laboratoire de microbiologie

CIUSSS de l'Estrie - CHUS