

Historique procédure PR-BM-131

Document Fiche

Numéro Du Doc: **PR-BM-131** Statut Document: **OBSOLETE**
Révision: **01** Type Document: **LS-PR**

1.Général 2.Propriété 3.Note 4.Checklist 5.Validat. 6.X_Réf. 7.Distribution 8.Revue 9.Historique

Révision	Emis	Obsolète	Statut
07	22/08/15		COURANT
06	21/05/04	22/08/15	OBSOLETE
05	21/01/18	21/05/04	OBSOLETE
04	20/06/01	21/01/18	OBSOLETE
03	20/03/12	20/06/01	OBSOLETE
02	20/03/02	20/03/12	OBSOLETE
01	20/02/17	20/03/02	OBSOLETE

Notes Révision

Commuter Voir Fermer



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	Hugues Charest
Réviser(s) :	Lyne Désautels
	Joel Ménard
Approbateur :	Bouchra Serhir
Coordonnateur du document :	Lyne Désautels

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document est une nouvelle procédure.

II. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

III. PRINCIPE

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine en fin 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS CoV) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'était pas connu. Cependant il est maintenant bien établi qu'il se transmet facilement de personne à personne.

Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées en parallèle afin d'augmenter la spécificité du test.

Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène de la transcriptase (RNA dépendant RNA polymérase : RdRP), un protocole présenté dans Corman et al. (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ce protocole a été fourni par le Laboratoire national de microbiologie de Winnipeg en février 2020. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ.

IV. SPÉCIMENS

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture, est inclus dans chaque série analysée

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) doit être effectuée en parallèle. Ainsi, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

V. MATÉRIEL REQUIS

A- RT-PCR et détection en temps réel

1. Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971).
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907).
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2. Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1 — Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1 et 2)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs.

VI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour chacune des cibles du contrôle positif d'amplification.

Vérifier les dates de péremption des réactifs nécessaires. Compléter le registre RE-BM-290.

VII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

Amplification par RT-PCR et détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

1. Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer les deux mélanges réactionnels selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.

Réactifs	Volume par réaction (µl)
TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX	5,0
2X Mélange d'amorces et de sondes A et B*	10,0

* Le registre RE-BM-291 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

2. Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl de dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
3. Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi ainsi que le contrôle positif d'amplification. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
5. Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

6. Passer au local postPCR. Inverser la plaque 3 fois, puis vortexer une dizaine de secondes. Centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la micro-centrifugeuse est atteinte).
7. Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2

53 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 3 s

60 °C 30 s

45 cycles

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : le QuantStudio 3 de Thermo Fisher est validé pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

VIII. RÉSULTATS

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 37 pour une des cibles, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le Mix en particulier [A ou B], à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Consulter l'aide-mémoire AI-BM-094.

IX. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

X. RÉFÉRENCES

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3199387/)

XI. DOCUMENTS ASSOCIÉS

- PR-BM-052 Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux
- PR-BM-098 Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific
- LI-BM-008 Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel.
- AI-BM-094 Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel [PR-BM-131]
- RE-BM-290 RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2
- RE-BM-291 Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
RdRP	RdRP_SARsR-F2 : GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G	RdRP_SARsR-R1 : CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA	RdRP_SARsR-P2: CAGGTGGAACCTCAGGAGATGC
N	nCoVLMN_Nf : CGT AGT CGA ACA GTT CAA G	nCoVLMN_Nf : AAG CAG CAG CAA AGC AAG	nCoVLMN_Np : AAC TTC TCC TGC TAG AAT GGC TGG CAA TG

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [[μ M]]	Amorces antisens [[μ M]]	Sondes	
				[[μ M]]	Fluorophore
A	RdRP	RdRP_SARsR-F2 [0,4]	RdRP_SARsR-R1 [0,4]	RdRP_SARsR-P2 [0,2]	FAM
B	N	nCoVLMN_Nf [0,4]	nCoVLMN_Nr [0,4]	nCoVLMN_Np [0,2]	FAM

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	Lyne Désautels
Réviser(s) :	Joel Ménard
	Hugues Charest
Approbateur :	Hugues Charest
Coordonnateur du document :	Lyne Désautels

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace la version 1 de cette procédure analytique. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
III. Principe	Retrait de la phrase : 'Ce protocole a été fourni par le Laboratoire national de microbiologie de Winnipeg en février 2020.'	Cette RT-PCR a été changée pour un nouveau test plus performant (voir CH-516)
VI. Spécimens	La note concernant le besoin d'extraire les acides nucléiques en parallèle pour une analyse NxTAG RPP a été modifiée afin de moduler l'obligation d'effectuer d'emblée des multiplex dans le contexte d'une demande de recherche de SARS-CoV-2.	Évolution dans la demande de tests pour CoVID-19.
VII. Exposé de la procédure; 1.	Changement du mix B pour le mix C	Afin de substituer le test du LNM pour celui du LSPQ
VIII. Résultats		
Annexe 1		

II. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

III. PRINCIPE

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine en fin 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS CoV) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'était pas connu. Cependant il est maintenant bien établi qu'il se transmet facilement de personne à personne.

Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées en parallèle afin d'augmenter la spécificité du test.

Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène de la transcriptase (RNA dépendant RNA polymerase : RdRP), un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020); le deuxième jeu cible le gène N en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ce protocole a été fourni par le Laboratoire national de microbiologie de Winnipeg en février 2020. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ.

IV. SPÉCIMENS

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture, est inclus dans chaque série analysée

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

V. MATÉRIEL REQUIS

A- RT-PCR et détection en temps réel

1. Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971).
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907).
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2. Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1 — Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1
- Échantillons contrôles positifs et négatifs.

VI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour chacune des cibles du contrôle positif d'amplification.

Vérifier les dates de péremption des réactifs nécessaires. Compléter le registre RE-BM-290.

VII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

Amplification par RT-PCR et détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

1. Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer les deux mélanges réactionnels selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.

Réactifs	Volume par réaction (µl)
TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX	5,0
2X Mélange d'amorces et de sondes A et C*	10,0

* Le registre RE-BM-291 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

2. Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl de dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
3. Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi ainsi que le contrôle positif d'amplification. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
5. Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

6. Passer au local postPCR. Inverser la plaque 3 fois, puis vortexer une dizaine de secondes. Centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la micro-centrifugeuse est atteinte).
7. Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2

53 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 3 s

60 °C 30 s

45 cycles

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : le QuantStudio 3 de Thermo Fisher est validé pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

VIII. RÉSULTATS

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 37 pour une des cibles, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le Mix en particulier [A ou C], à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Consulter l'aide-mémoire AI-BM-094.

IX. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

X. RÉFÉRENCES

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3199387/)

XI. DOCUMENTS ASSOCIÉS

- PR-BM-052 Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux
- PR-BM-098 Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific
- LI-BM-008 Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel.
- AI-BM-094 Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel [PR-BM-131]
- RE-BM-290 RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2
- RE-BM-291 Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
RdRP	RdRP_SARSr-F2 : GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G	RdRP_SARSr-R1 : CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA	RdRP_SARSr-P2: CAGGTGGAACCTCAGGAGATGC
N	WuhanCoVNF : AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	WuhanCoVNr : CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	CoVNP : CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [[μ M]]	Amorces antisens [[μ M]]	Sondes	
				[[μ M]]	Fluorophore
A	RdRP	RdRP_SARSr-F2 [0,4]	RdRP_SARSr-R1 [0,4]	RdRP_SARSr-P2 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVNF : [0,4]	WuhanCoVNr: [0,4]	CoVNP [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	Lyne Désautels
Réviser(s) :	Joel Ménard
	Hugues Charest
Approbateur :	Hugues Charest
Coordonnateur du document :	Lyne Désautels

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace la version 2 de cette procédure analytique. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
III. Principe	Retrait de la référence au gène RdRP et ajout de celle du gène E.'	Cette RT-PCR a été changée pour un nouveau test plus performant (voir CH-516)
VII. Exposé de la procédure; 1.	Changement du mix A pour le mix E	Voir CH-516, afin de substituer le test ciblant RdRP pour celui ciblant le gène E du protocole de Corman <i>et al.</i>
VIII. Résultats		
Annexe 1		

II. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

III. PRINCIPE

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine en fin 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS CoV) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'était pas connu. Cependant il est maintenant bien établi qu'il se transmet facilement de personne à personne.

Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées en parallèle afin d'augmenter la spécificité du test.

Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ.

IV. SPÉCIMENS

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture, est inclus dans chaque série analysée

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN).

L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

V. MATÉRIEL REQUIS

A- RT-PCR et détection en temps réel

1. Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971).
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907).
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2. Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1 — Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs.

VI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour chacune des cibles du contrôle positif d'amplification.

Vérifier les dates de péremption des réactifs nécessaires. Compléter le registre RE-BM-290.

VII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

Amplification par RT-PCR et détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

1. Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer les deux mélanges réactionnels selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.

Réactifs	Volume par réaction (µl)
TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX	5,0
2X Mélange d'amorces et de sondes E et C*	10,0

* Le registre RE-BM-291 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

2. Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl de dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
3. Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi ainsi que le contrôle positif d'amplification. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
5. Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

6. Passer au local postPCR. Inverser la plaque 3 fois, puis vortexer une dizaine de secondes. Centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la micro-centrifugeuse est atteinte).
7. Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2

53 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 3 s

60 °C 30 s

45 cycles

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : le QuantStudio 3 de Thermo Fisher est validé pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

VIII. RÉSULTATS

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans

l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 37 pour une des cibles, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le Mix en particulier [C ou E], à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Consulter l'aide-mémoire AI-BM-094.

IX. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

X. RÉFÉRENCES

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3199387/)

XI. DOCUMENTS ASSOCIÉS

- PR-BM-052 Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux
- PR-BM-098 Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific
- LI-BM-008 Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel.
- AI-BM-094 Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel [PR-BM-131]
- RE-BM-290 RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2
- RE-BM-291 Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	E_Sarbeco_F1 : ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	E_Sarbeco_R2 : ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	E_Sarbeco_P1: ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
N	WuhanCoVnf : AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	WuhanCoVnr : CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	CoVnp : CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [[μ M]]	Amorces antisens [[μ M]]	Sondes	
				[μ M]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVnf : [0,4]	WuhanCoVnr: [0,4]	CoVnp [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

Noms	
Auteur(s) :	Lyne Désautels
<hr/>	
Réviser(s) :	Joel Ménard
<hr/>	
<hr/>	
<hr/>	
Approbateur :	Donald Murphy
<hr/>	
Coordonnateur du document :	Lyne Désautels
<hr/>	

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ce document remplace la version 3 de cette procédure analytique. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
Toutes les sections	Ajouts d'informations.	Nouveau contrôle d'extraction à ajouter à l'analyse et retrait du contrôle d'amplification.
Annexe 2	Ajout	Nouvelle annexe pour la préparation du contrôle d'extraction.

II. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

III. PRINCIPE

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine en fin 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS CoV) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'était pas connu. Cependant il est maintenant bien établi qu'il se transmet facilement de personne à personne.

Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées en parallèle afin d'augmenter la spécificité du test.

Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ.

IV. SPÉCIMENS

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052 ou PR-BM-096), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture et un contrôle d'extraction positif (voir Annexe 2), est inclus dans chaque série analysée.

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du

milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

V. MATÉRIEL REQUIS

A- RT-PCR et détection en temps réel

1. Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971).
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907).
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2. Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1 — Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs.

VI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour chacune des cibles du contrôle positif d'extraction.

Vérifier les dates de péremption des réactifs nécessaires. Compléter le registre RE-BM-290.

VII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

Amplification par RT-PCR et détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

1. Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer les deux mélanges réactionnels selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.

Réactifs	Volume par réaction (µl)
TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX	5,0
2X Mélange d'amorces et de sondes E et C*	10,0

* Le registre RE-BM-291 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

2. Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl de dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
3. Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi ainsi que le contrôle positif d'amplification. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
5. Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

6. Passer au local postPCR. Inverser la plaque 3 fois, puis vortexer une dizaine de secondes. Centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la micro-centrifugeuse est atteinte).
7. Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2

53 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 3 s

60 °C 30 s

45 cycles

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : le QuantStudio 3 de Thermo Fisher est validé pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

VIII. RÉSULTATS

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 37 pour l'une des cibles ou si le contrôle positif ne rencontre pas la valeur attendue, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le Mix en particulier [C ou E], à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Consulter l'aide-mémoire AI-BM-094.

IX. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

X. RÉFÉRENCES

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3199387/)

XI. DOCUMENTS ASSOCIÉS

- PR-BM-052 Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux
- PR-BM-098 Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific
- LI-BM-008 Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel.
- AI-BM-094 Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel [PR-BM-131]
- RE-BM-290 RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2
- RE-BM-291 Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	E_Sarbeco_F1 : ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	E_Sarbeco_R2 : ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	E_Sarbeco_P1: ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
N	WuhanCoVnf : AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	WuhanCoVnr : CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	CoVnp : CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [[μ M]]	Amorces antisens [[μ M]]	Sondes	
				[μ M]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVnf : [0,4]	WuhanCoVnr: [0,4]	CoVnp [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1

Annexe 2

Préparation du contrôle positif d'extraction

1. Sélectionner un spécimen clinique ayant obtenu un résultat positif pour le gène N (Mix C) ayant une valeur Ct d'environ 12-13.
2. Prendre un flacon de 500 ml de MEM (Minimum Essential Medium).
3. Dans un tube sarstedt 1,5 ml, faire une dilution de 400 μ l de MEM et ajouter 100 μ l de l'échantillon positif sélectionné en 1. Vortexer quelques secondes, faire une brève centrifugation.
4. Prendre la totalité de la dilution préparée à l'étape 3 et la transférer dans le flacon de 500 ml de MEM.
5. Mélanger le flacon par inversion environ 30 secondes pour que le mélange soit homogène.
6. Distribuer 250 μ l dans des tubes sarstedt ou dans des boîtes bleues (collection microtubes 96 puits de QIAGEN).
7. Compléter le RE-BM-123.



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	<u>Lyne Désautels</u>

Réviser(s) :	<u>Joel Ménard</u>
	<u>Martine Morin</u>

Approbateur :	<u>Hugues Charest</u>
Coordonnateur du document :	<u>Lyne Désautels</u>

1 Préambule

Ce document remplace la version 3 de cette procédure analytique. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
Toutes les sections	Ajout du Quantstudio 5 à la liste des appareils de détection en temps réel.	Nouvel appareil.
7. Exposé de la procédure	Type d'analyse.	Différence dans la préparation des <i>mix</i> pour une demande de Détection et/ou de Confirmation
8. Résultats	Information sur les résultats inscrit pour le test de confirmation (CCOV). Critères des reprises pour les échantillons analysés individuellement et en pool.	Nouveauté. Explications sur le rendu des résultats.

2 Champ d'application

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

3 Principe

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine à la fin de 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-1) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'est pas connu. Il est maintenant bien établi qu'il se transmet facilement de personne à personne.

Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées.

Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ. Pour les demandes d'analyses codées NCOV dans le SGIL (détection), une seule réaction RT-PCR est utilisée (généralement celle ciblant le gène N); pour les demandes de confirmation (CCOV dans SGIL), les deux réactions sont effectuées d'emblée.

4 Spécimens

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052 ou PR-BM-096), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture et un contrôle d'extraction positif (voir annexe 2), est inclus dans chaque série analysée.

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

5 Matériel requis

5.1 RT-PCR et détection en temps réel

1) Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 ou 5 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971)
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907)
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2) Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1- Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs

6 Contrôle de la qualité

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour le contrôle positif d'extraction.

Vérifier les dates de péremption des réactifs. Compléter le registre RE-BM-290.

7 Exposé de la procédure

Amplification par RT-PCR et détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

- 1) Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer le ou les mélanges réactionnels selon les analyses demandées et selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.
 - Pour une demande de **Détection** (NCOV), préparez le mix C (gène N)
 - Pour une demande de **Confirmation** (CCOV), préparez les mix C et E (gènes N et E)

Réactifs	N° lot ou date de fabrication	Date de péremption	Volume (µl) par réaction	Volume total
4X TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX			5,0	
Mix amorces/sondes	E : C :	E : C :	10,0	

* Le registre RE-BM-290 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.


- 2) Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl par puit dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
- 3) Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.

- 4) Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : Ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

- 5) Passer au local post PCR, vortexer une dizaine de secondes puis centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la microcentrifugeuse est atteinte).

- 6) Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2			
	53 °C	10 min	
	95 °C	2 min	
	95 °C	3 sec	45 cycles
	60 °C	30 sec	

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : les QuantStudio 3 et 5 de Thermo Fisher sont validés pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

8 Résultats

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 40 pour l'une des cibles ou si le contrôle positif ne rencontre pas la valeur attendue, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le ou les Mix en particulier (C ou E), à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques. Une épreuve de confirmation (CCOV) pour laquelle une seule des deux cibles produit un résultat positif, le résultat final inscrit automatiquement dans SGIL est 'indéterminé'.

Les échantillons présentant une Ct supérieure à 35, mais inférieure à 40 pourraient être reanalysés afin de confirmer le résultat.

Échantillons en « Pool » ou en tube individuel

Les résultats des échantillons individuels sont rapportés tel que générés et transférés dans le SGIL par l'appareillage, soit détecté ou non détecté, selon leur valeur de Ct..

Les échantillons qui ont été « poolés » sont traités comme suit :

- Pool négatif : tous les échantillons contenus dans le pool sont rapportés négatifs.
- Pool positif : tous les échantillons contenus dans le pool doivent être extraits et analysés de façon individuelle. Le résultat obtenu pour chacun est alors rapporté tel que généré par l'appareil, soit positif ou négatif selon et avec leur valeur ct respective

Consulter les aide-mémoire AI-BM-094 et AI-BM-101

9 Enregistrement des données

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 ou 5 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

10 Références

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](#)

11 Documents associés

- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux (**PR-BM-052**)
- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — EMAG de bioMérieux (**PR-BM-096**)
- Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific (**PR-BM-098**)
- Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel (**LI-BM-008**)
- Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-094**)
- Saisie des résultats et validation — Confirmation SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-101**)
- RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2 (**RE-BM-290**)
- Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**RE-BM-291**)

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	E_Sarbeco_F1 : ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	E_Sarbeco_R2 : ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	E_Sarbeco_P1 : ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
N	WuhanCoVnf : AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	WuhanCoVnr : CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	CoVnp : CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [μ M]	Amorces antisens [μ M]	Sondes	
				[μ M]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVnf : [0,4]	WuhanCoVnr: [0,4]	CoVnp [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1

Annexe 2

Préparation du contrôle positif d'extraction

- 1) Sélectionner un spécimen clinique ayant obtenu un résultat positif pour le gène N (Mix C) ayant une valeur Ct d'environ 12-13.
- 2) Prendre un flacon de 500 ml de MEM (Minimum Essential Medium).
- 3) Dans un tube sarstedt 1,5 ml, faire une dilution de 400 µl de MEM et ajouter 100 µl de l'échantillon positif sélectionné en 1. Vortexer quelques secondes, faire une brève centrifugation.
- 4) Prendre la totalité de la dilution préparée à l'étape 3 et la transférer dans le flacon de 500 ml de MEM.
- 5) Mélanger le flacon par inversion environ 30 secondes pour que le mélange soit homogène.
- 6) Distribuer 250 µl dans des tubes sarstedt ou dans des boîtes bleues (collection microtubes 96 puits de QIAGEN).
- 7) Compléter le RE-BM-123.



Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	<u>Lyne Désautels</u>

Réviser(s) :	<u>Joel Ménard</u>
	<u>Mélanie Côté</u>

Approbateur :	<u>Hugues Charest</u>
Coordonnateur du document :	<u>Lyne Désautels</u>

1 Préambule

Ce document remplace le document PR-BM-131 version 04.. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
3. Principe	Ajout d'explications concernant la détection des variants à surveillance rehaussée (VSR)	Nouvelles épreuves analytiques (informations ajoutées à la CH-516).
7.1 Exposé de la procédure	Ajout pour une demande de recherche de variants Ajout des 2 nouveaux mélanges dans le tableau : Ewt3 et 501	
8. Résultats	Ajout de 2 points séparés : 1 pour détection et confirmation et 2 pour variants/ciblage	Pour préciser la distinction entre les tests et les différences dans l'entrées des résultats
Annexe 1	Ajout des séquences des amorces et sondes pour Swt3aby, FAM-N501 et JUN-Y501 Ajout des composantes des mélanges réactionnel pour mix Ewt3 et 501	Nouvelles cibles pour tester les variants et nouveaux mélanges réactionnels

2 Champ d'application

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

3 Principe

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine à la fin de 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-1) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'est pas connu. Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées. Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020); le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ. Pour les demandes d'analyses codées NCOV dans le SGIL (détection), une seule réaction RT-PCR est utilisée (généralement celle ciblant le gène N); pour les demandes de confirmation (CCOV dans SGIL), les deux réactions sont effectuées d'emblée.

Depuis son saut chez l'humain en 2019, le virus CoV SRAS-2 évolue et acquiert des nouvelles caractéristiques génétiques. Les souches circulantes sont maintenant catégorisées en clades et en variants. Quelques mutations clés dans la protéine *spike* (spicule), entre autres, sont reconnues pour contribuer à une augmentation de la contagiosité, de la virulence et/ou pour modifier les épitopes ciblés par les vaccins. Ces souches sont regroupées sous l'appellation 'variants à surveillance rehaussée (VSR)'. Identifier les souches portant ces mutations (criblage) permet des interventions de santé publique particulières visant à minimiser leur expansion. Des essais RT-PCR multiplex de

criblage pour les mutations Del 69/70 et N501Y sont inclus dans cette procédure. L'essai pour le Del69-70 a été développé au LSPQ, celui pour la 501Y a été adaptée d'une procédure fournie par le laboratoire de l'Ontario Public Health.

4 Spécimens

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052 ou PR-BM-096), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture et un contrôle d'extraction positif (voir annexe 2), est inclus dans chaque série analysée.

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

5 Matériel requis

5.1 RT-PCR et détection en temps réel

1) Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 ou 5 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971)
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907)

- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2) Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1- Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs

6 Contrôle de la qualité

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour le contrôle positif d'extraction pour les essais de détection et de criblage. Le contrôle positif d'extraction sélectionné est un «wildtype», c'est-à-dire détecté pour COVID mais sans présence de mutations. Vérifier les dates de péremption des réactifs. Compléter le registre RE-BM-290.

7 Exposé de la procédure

Amplification par RT-PCR avec détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

- 1) Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer le ou les mélanges réactionnels selon les analyses demandées et selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.
 - Pour une demande de **Détection** (NCOV), préparer le mix C (gène N)
 - Pour une demande de **Confirmation** (CCOV), préparer les mix C et E (gènes N et E)
 - Pour une demande de **Variants/criblage** (VMUT), préparer les mix Ewt3 et 501 (gènes E, Swt3aby (Del 69-70), FAM-N501 et JUN-Y501). Tous les échantillons sont criblés d'emblée pour les deux mutations.

Réactifs	N° lot ou date de fabrication	Date de péremption	Volume (µl) par réaction	Volume total
4X TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX			5,0	
Mix amorces/sondes	E : C : Ewt3 : 501 :		10,0	


* Le registre RE-BM-290 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

- 2) Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl par puit dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
- 3) Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
- 4) Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : Ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

- 5) Passer au local post PCR, vortexer une dizaine de secondes puis centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la microcentrifugeuse est atteinte).
- 6) Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2			
	53 °C	10 min	
	95 °C	2 min	
	95 °C	3 sec	45 cycles
	60 °C	30 sec	

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : les QuantStudio 3 et 5 de Thermo Fisher sont validés pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

8 Résultats

1) Pour les tests de détection et de confirmation :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Pour une épreuve de détection un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à

celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 40 pour l'une des cibles ou si le contrôle positif ne rencontre pas la valeur attendue, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois pour le ou les Mix en particulier (C ou E), à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques. Une épreuve de confirmation (CCOV) pour laquelle une seule des deux cibles produit un résultat positif, le résultat final inscrit automatiquement dans SGIL est 'indéterminé'.

Les échantillons présentant une Ct supérieure à 37, mais inférieure à 40 pourraient être réanalysés afin de confirmer le résultat.

Échantillons en « Pool » ou en tube individuel

Les résultats des échantillons individuels sont rapportés tel que générés et transférés dans le SGIL par l'appareillage, soit détecté ou non détecté, selon leur valeur de Ct.

Les échantillons qui ont été « poolés » sont traités comme suit :

- Pool négatif : tous les échantillons contenus dans le pool sont rapportés négatifs.
- Pool positif : tous les échantillons contenus dans le pool doivent être extraits et analysés de façon individuelle. Le résultat obtenu pour chacun est alors rapporté tel que généré par l'appareil, soit positif ou négatif selon et avec leur valeur ct respective

2) Pour les tests de variants/criblage :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction pour la cible E uniquement. . Les profils d'amplification de chacune des réactions de criblage sont les suivants :

1) Del69-70 (réaction multiplexée avec la PCR de détection du gène E).

C'est l'allure de la courbe d'amplification (en ABY) qui permet de distinguer les souches ayant la délétion de celles qui contiennent les 6 nucléotides codant pour les acides aminés 69 et 70 (i.e. la souche sauvage ou wt, pour *wildtype*). L'amplification à partir d'acides nucléiques de souches wt est logarithmique comme celle du contrôle positif puisque la sonde Spwt3 est parfaitement; celle de souches mutées montre un ΔR_n très diminué et dont l'allure est facilement reconnaissable. À des valeurs de Ct faibles (pour le gène E), cette dernière amplification est pratiquement indétectable.

2) Mutation N501Y (PCR compétitive)

Une souche doit produire une amplification avec allure logarithmique avec l'une ou l'autre des deux sondes. Si l'amplification est détectable en JUN, la souche porte la mutation N501Y; celle en FAM est spécifique à la souche sauvage (N501). Si aucune amplification n'est détectée et que la charge virale est détectable (résultat au PCR du gène E), il peut s'agir d'un problème de

spécificité des sondes dû à du polymorphisme dans les séquences bordant le site codant pour l'acide aminé 501 du gène S.

Tout profil d'amplification qui diffère des situations susmentionnées est évalué par le responsable de ces analyses.

Consulter les aide-mémoire AI-BM-094 (NCOV), AI-BM-101 (CCOV) et AI-BM-104(VMUT).

9 Enregistrement des données

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 ou 5 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

10 Références

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](#)

11 Documents associés

- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux (**PR-BM-052**)
- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — EMAG de bioMérieux (**PR-BM-096**)
- Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific (**PR-BM-098**)
- Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel (**LI-BM-008**)
- Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-094**)
- Saisie des résultats et validation — Confirmation SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-101**)
- Saisie des résultats et validation – SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (PR-BM-131) Analyse VMUT (**AI-BM-104**)
- RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2 (**RE-BM-290**)
- Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**RE-BM-291**)

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	E_Sarbeco_F1 : ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	E_Sarbeco_R2: ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	E_Sarbeco_P1: ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
N	WuhanCoVnf : AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G	WuhanCoVnr : CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT	CoVnp : CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C
Swt3aby	Sforw : CAA TGT TAC TTG GTT CCA TG	Srev: CAT CAT TAA ATG GTA GGA CAG	Swt3Aby : ACA TGT CTC TGG GAC CAA TGG TA
FAM-N501	501F: GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT C	501R: AAA CAG TTG CTG GTG CAT GT	FAM-N501: CCA ACC CAC TAA TGG TGT TG
JUN-Y501	501F: GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT C	501R: AAA CAG TTG CTG GTG CAT GT	JUN-Y501 : CCA ACC CAC TTA TGG TGT TG

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [μ M]	Amorces antisens [μ M]	Sondes	
				[μ M]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
C	N (LSPQ)	WuhanCoVnf [0,4]	WuhanCoVnr [0,4]	CoVnp [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
Ewt3	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	Swt3aby	Sforw [0,4]	Srev [0,4]	Swt3aby [0,2]	ABY
501	FAM-N501	501F [0,4]	501R [0,4]	FAM-N501 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	JUN-Y501			JUN-Y501 [0,2]	JUN

Annexe 2

Préparation du contrôle positif d'extraction

- 1) Sélectionner un spécimen clinique (de préférence «wildtype»)ayant obtenu un résultat positif pour le gène N (Mix C) ayant une valeur Ct d'environ 12-13.
- 2) Prendre un flacon de 500 ml de MEM (Minimum Essential Medium).
- 3) Dans un tube sarstedt 1,5 ml, faire une dilution de 400 µl de MEM et ajouter 100 µl de l'échantillon positif sélectionné en 1. Vortexer quelques secondes, faire une brève centrifugation.
- 4) Prendre la totalité de la dilution préparée à l'étape 3 et la transférer dans le flacon de 500 ml de MEM.
- 5) Mélanger le flacon par inversion environ 30 secondes pour que le mélange soit homogène.
- 6) Distribuer 250 µl dans des tubes sarstedt ou dans des boîtes bleues (collection microtubes 96 puits de QIAGEN).
- 7) Compléter le RE-BM-123.

Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR avec détection en temps réel

	Noms
Auteur(s) :	<u>Lyne Désautels</u>

Réviser(s) :	<u>Catherine Arsenault</u>

Approbateur :	<u>Hugues Charest</u>
Coordonnateur du document :	<u>Lyne Désautels</u>

1 Préambule

Ce document remplace le document PR-BM-131 version 06. Les changements apportés dans cette version sont les suivants :

Section	Modification	Justification
7.1 Exposé de la procédure	Retrait des mentions concernant la détection et la confirmation de cas en utilisant la PCR N du LSPQ (mix C). Ajout d'une sonde spécifique au variant Omicron dans le mélange réactionnel 501.	Actualisation du 2021-12.
8. Résultats	Ajustement au texte et aux mélanges réactionnels	
Annexe 1	Ajout de la séquence 501Y-omiABY.	

2 Champ d'application

Ce document est destiné au personnel du secteur Biologie moléculaire.

3 Principe

Le SARS-CoV-2 (auparavant nommé 2019-nCoV) est un virus du genre des Betacoronavirus apparu dans la région de la ville de Wuhan en Chine à la fin de 2019. Il possède 80 % d'identité avec le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-1) au niveau des acides nucléiques. Le réservoir zoonotique n'est pas connu. Dans les épreuves de détection par RT-PCR présentée ici, deux réactions ciblant deux régions distinctes du génome sont utilisées. Un premier jeu d'oligonucléotides amplifie un fragment du gène E, un protocole présenté dans Corman *et al.* (2020) ; le deuxième jeu cible le gène N (développé au LSPQ) en 3' du génome, gène dont l'ARNm est le plus fortement représenté dans les cellules infectées. Ces protocoles RT-PCR ont été adaptés pour les réactifs et l'appareillage déjà en usage au LSPQ. Pour les demandes d'analyses codées NCOV dans le SGIL (détection), une seule réaction RT-PCR est utilisée (généralement celle ciblant le gène N); pour les demandes de confirmation (CCOV dans SGIL), les deux réactions sont effectuées d'emblée.

Depuis son saut chez l'humain en 2019, le virus CoV SRAS-2 évolue et acquiert des nouvelles caractéristiques génétiques. Les souches circulantes sont maintenant catégorisées en clades et en variants. Quelques mutations clés dans la protéine *spike* (spicule), entre autres, sont reconnues pour contribuer à une augmentation de la contagiosité, de la virulence et/ou pour modifier les épitopes ciblés par les vaccins. Ces souches sont regroupées sous l'appellation 'variants à surveillance réhaussée (VSR)'. Identifier les souches portant ces mutations (criblage) permet des interventions de santé publique particulières visant à minimiser leur expansion. Des essais RT-PCR multiplex de criblage pour les mutations Del 69/70 et N501Y sont inclus dans cette procédure. L'essai pour le Del69-70 a été développé au LSPQ, celui pour la 501Y a été adaptée d'une procédure fournie par le laboratoire de l'Ontario Public Health.

4 Spécimens

Extraits d'acides nucléiques préparés à l'aide d'une plateforme robotisée (PR-BM-052 ou PR-BM-096), ou selon la procédure PR-BM-010. Un échantillon contrôle d'extraction négatif, typiquement du milieu de culture et un contrôle d'extraction positif (voir annexe 2), est inclus dans chaque série analysée.

Une analyse avec la trousse NxTAG Respiratory Pathogen Panel (RPP) de Luminex (PR-BM-119) peut être effectuée en parallèle. Le cas échéant, il est nécessaire d'effectuer deux extractions des acides nucléiques séparées pour chaque spécimen, car le volume d'élution pour cette technique est de 110 µl au lieu de 60 µl.

Note : les échantillons présentant de la matière en suspension ou dont la mucosité/viscosité rend le pipetage difficile sont traités par passage sur colonnes QIAshredder (QIAGEN). L'échantillon est déposé sur la colonne et est centrifugé durant 1 minute à 14 000 RPM. Du milieu de culture virale peut-être ajouté à l'échantillon pour faciliter le passage à travers la matrice de la colonne. **Le traitement d'un échantillon par cette méthode doit être noté sur le registre de travail associé à la procédure d'extraction utilisée.**

Volume minimum nécessaire : 0,5 ml

5 Matériel requis

5.1 RT-PCR et détection en temps réel

1) Appareillages et jetables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µl à 1000 µl
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µl à 1000 µl
- Tubes de 1,5 ml ou 2,0 ml stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt
- Microcentrifugeuse
- Agitateur-mélangeur à vortex
- Support réfrigéré pour plaque 96 puits
- QuantStudio 3 ou 5 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent
- MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, no cat : 4311971)
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml (ABI, no cat: 4346907)
- Pellicule scellante pour plaque de format 96 puits, pour transport entre locaux

2) Trousses et Réactifs

- Mélange réactionnel TaqPath 1- Step Multiplex NO ROX de la compagnie Thermo Fisher Scientific (disponible en plusieurs formats)
- Solution d'amorces et de sondes 2X pour chaque multiplex (les séquences et les quantités utilisées sont présentées à l'annexe 1)
- Échantillons contrôles positifs et négatifs

6 Contrôle de la qualité

L'efficacité de l'amplification pour chaque cible est contrôlée par l'analyse des valeurs Ct obtenues pour le contrôle positif d'extraction pour les essais de détection et de criblage. Le contrôle positif d'extraction sélectionné est un «wildtype», c'est-à-dire détecté pour COVID mais sans présence de mutations. Vérifier les dates de péremption des réactifs. Compléter le registre RE-BM-290.

7 Exposé de la procédure

Amplification par RT-PCR avec détection en temps réel

D'abord s'assurer d'avoir un appareil de détection en temps réel allumé en post-PCR ; préparer le schéma de plaque ; consulter le document PR-BM-098.

- 1) Au local des réactifs, à l'aide du registre RE-BM-290, préparer le ou les mélanges réactionnels selon les analyses demandées et selon les quantités suivantes par échantillon, et bien mélanger.
 - Pour une demande de Détection (NCOV) ou de **Confirmation** (CCOV), préparer le mix E (gène E).
 - Pour la validation mensuel de la TaqPath, préparer le mix C (gène N).
 - Pour une demande de **Variants/criblage** (VMUT), préparer les mix Ewt3 (gènes E, Swt3aby (Del 69-70), et 501trio-omi (FAM-N501, 501Y-omiABY et JUN-Y501). Tous les échantillons sont criblés d'emblée pour les deux mutations.

Réactifs	N° lot ou date de fabrication	Date de péremption	Volume (µl) par réaction	Volume total
4X TaqPath 1-Step Multiplex NO ROX			5,0	
Mix amorces/sondes	E : C : Ewt3 : 501trio-omi :		10,0	


* Le registre RE-BM-290 présente les recettes des mélanges d'amorces et sondes. Il est conservé au local des réactifs.

Note : conserver les mélanges réactionnels sur glace ou sur un support réfrigéré.

- 2) Pour chaque mélange d'amorces et sonde, distribuer 15 µl par puit dans une plaque de 96 puits sur un portoir ABI sans glace selon le schéma de travail établi et apposer une pellicule scellante pour le transport entre locaux.
- 3) Passer à un local préPCR et ajouter 5 µl de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques à chaque mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi. N'ouvrir qu'une seule languette de bouchons à la fois.
- 4) Retirer la feuille protectrice d'un ruban optique ABI et sceller la plaque 96 puits.

Note : Ne pas toucher au ruban optique avec les doigts.

- 5) Passer au local post PCR, vortexer une dizaine de secondes puis centrifuger la plaque une dizaine de secondes (lorsque la vitesse maximale de la microcentrifugeuse est atteinte).
- 6) Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel et démarrer la méthode préprogrammée suivante :

SARS-CoV-2			
	53 °C	10 min	
	95 °C	2 min	
	95 °C	3 sec	45 cycles
	60 °C	30 sec	

Consulter le document PR-BM-098 et/ou la liste LI-BM-008.

Note : les QuantStudio 3 et 5 de Thermo Fisher sont validés pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C.

8 Résultats

1) Pour les tests de détection et de confirmation :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction.

Pour une épreuve de détection un résultat est considéré comme positif lorsque la valeur de Ct est égale ou inférieure à 37. La courbe d'amplification doit être d'allure logarithmique et ressembler à celle du contrôle positif. Si la valeur de Ct de l'échantillon contrôle négatif est inférieure à 40 pour l'une des cibles ou si le contrôle positif ne rencontre pas la valeur attendue, tous les échantillons de la série devront être analysés une 2^e fois à partir de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Les échantillons présentant une Ct supérieure à 37, mais inférieure à 40 pourraient être réanalysés afin de confirmer le résultat.

Échantillons en « Pool » ou en tube individuel

Les résultats des échantillons individuels sont rapportés tel que générés et transférés dans le SGIL par l'appareillage, soit détecté ou non détecté, selon leur valeur de Ct.

Les échantillons qui ont été « poolés » sont traités comme suit :

- Pool négatif : tous les échantillons contenus dans le pool sont rapportés négatifs.
- Pool positif : tous les échantillons contenus dans le pool doivent être extraits et analysés de façon individuelle. Le résultat obtenu pour chacun est alors rapporté tel que généré par l'appareil, soit positif ou négatif selon et avec leur valeur ct respective

2) Pour les tests de variants/criblage :

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de concentration threshold [Ct]. Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifique amplifié par la réaction pour la cible E uniquement. Les profils d'amplification de chacune des réactions de criblage sont les suivants :

1) Del69-70 (réaction multiplexée avec la PCR de détection du gène E).

C'est l'allure de la courbe d'amplification (en ABY) qui permet de distinguer les souches ayant la délétion de celles qui contiennent les 6 nucléotides codant pour les acides aminés 69 et 70 (i.e. la souche sauvage ou wt, pour *wildtype*). L'amplification à partir d'acides nucléiques de souches wt est logarithmique comme celle du contrôle positif puisque la sonde Spwt3 est parfaitement; celle de souches mutées montre un ΔR_n très diminué et dont l'allure est facilement reconnaissable. À des valeurs de Ct faibles (pour le gène E), cette dernière amplification est pratiquement indétectable.

2) Mutation N501Y (PCR compétitive)

Une souche doit produire une amplification avec allure logarithmique avec l'une ou l'autre des trois sondes. Si l'amplification est détectable en JUN, la souche porte la mutation N501Y des variants Alpha et Gamma; celle en FAM est spécifique à la souche sauvage (N501), et celle en ABY reconnaît spécifiquement la mutation N501Y d'Omicron. Si aucune amplification n'est détectée et que la charge virale est détectable (résultat au PCR du gène E), il peut s'agir d'un problème de spécificité des sondes dû à du polymorphisme dans les séquences bordant le site codant pour l'acide aminé 501 du gène S.

Tout profil d'amplification qui diffère des situations susmentionnées est évalué par le responsable de ces analyses.

Consulter les aide-mémoire AI-BM-094 (NCOV), AI-BM-101 (CCOV) et AI-BM-104(VMUT).

9 Enregistrement des données

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le Quantstudio3 ou 5 dans le cartable correspondant à cette procédure au secteur Biologie moléculaire.

10 Références

Corman *et al.* (2020). Euro Surveil 25. PMID : [3199387](#)

11 Documents associés

- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — easyMAG de bioMérieux (**PR-BM-052**)
- Extraction automatisée d'acides nucléiques — plateforme NucliSens™ — EMAG de bioMérieux (**PR-BM-096**)
- Utilisation et entretien du QuantStudio3 et Quantstudio5 de la compagnie Thermo Fischer Scientific (**PR-BM-098**)
- Méthodes préprogrammées pour la détection en temps réel (**LI-BM-008**)
- Saisie des résultats et validation — Détection SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-094**)
- Saisie des résultats et validation — Confirmation SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**AI-BM-101**)
- Saisie des résultats et validation – SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (PR-BM-131) Analyse VMUT (**AI-BM-104**)
- RT-PCR en temps réel — Détection du SARS-CoV-2 (**RE-BM-290**)
- Préparation des mélanges d'amorces et sondes — Recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (**RE-BM-291**)

Annexe 1

Séquence des amorces et sondes

Cible	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
E	E_Sarbeco_F1 : ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	E_Sarbeco_R2: ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	E_Sarbeco_P1: ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG
Swt3aby	Sforw : CAA TGT TAC TTG GTT CCA TG	Srev: CAT CAT TAA ATG GTA GGA CAG	Swt3Aby : ACA TGT CTC TGG GAC CAA TGG TA
FAM-N501	501F: GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT C	501R: AAA CAG TTG CTG GTG CAT GT	FAM-N501: CCA ACC CAC TAA TGG TGT TG
JUN-Y501			JUN-Y501 : CCA ACC CAC TTA TGG TGT TG
			501Y-omiABY CCG ACC CAC TTA TGG TGT TG

Composition des mélanges réactionnels

Mix	Cible	Amorces sens [µM]	Amorces antisens [µM]	Sondes	
				[µM]	Fluorophore
E	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
Ewt3	E (Corman)	E_Sarbeco_F1 [0,4]	E_Sarbeco_R2 [0,4]	E_Sarbeco_P1 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	Swt3aby	Sforw [0,4]	Srev [0,4]	Swt3aby [0,2]	ABY-QSY
501	N501	501F [0,4]	501R [0,4]	FAM-N501 [0,2]	FAM (ZEN)-IABQ1
	Y501			JUN-Y501 [0,2]	JUN -QSY
	N501Y Omicron			501Y-omiABY [0,2]	ABY -QSY

Annexe 2

Préparation du contrôle positif d'extraction

- 1) Sélectionner un spécimen clinique (de préférence «wildtype»)ayant obtenu un résultat positif pour le gène E (Mix E) ayant une valeur Ct d'environ 12-13.
- 2) Prendre un flacon de 500 ml de MEM (Minimum Essential Medium).
- 3) Dans un tube sarstedt 1,5 ml, faire une dilution de 400 µl de MEM et ajouter 100 µl de l'échantillon positif sélectionné en 1. Vortexer quelques secondes, faire une brève centrifugation.
- 4) Prendre la totalité de la dilution préparée à l'étape 3 et la transférer dans le flacon de 500 ml de MEM.
- 5) Mélanger le flacon par inversion environ 30 secondes pour que le mélange soit homogène.
- 6) Distribuer 250 µl dans des tubes sarstedt ou dans des boîtes bleues (collection microtubes 96 puits de QIAGEN).
- 7) Compléter le RE-BM-123.

Proposition de définition pour une faible quantité d'ARN viral détectée

Mars 2022 – version 2.0 Modifications apportées en jaune

Sommaire*

Mise en contexte	1
L'interprétation du cycle seuil (ct) lors de l'analyse de TAAN SARS-COV-2	2
Définition	4
Rapport	5

MISE EN CONTEXTE

Ce guide de laboratoire s'adresse aux microbiologistes responsables des analyses de détection de SRAS-CoV-2 par TAAN en laboratoire. Ce document est une mise à jour du document du même titre publié en octobre 2020.

Les membres du comité PCR clinique du SARS-CoV-2, regroupant les microbiologistes responsables des analyses en laboratoire ont été consultés en février 2022, suite à une demande de mise à jour du guide provenant des microbiologistes dans la foulée de la vague Omicron et la diminution de l'accès au TAAN en laboratoire pour la clientèle ambulatoire. En effet, il devient plus difficile de documenter par TAAN une infection à SRAS-COV-2 et lors de l'arrivée en milieu de soins, des patients présentent *de novo* un résultat de TAAN positif qui peut être en fait une manifestation d'excrétion tardive d'ARN résultant d'une ancienne infection.

Il est important de noter que les variants préoccupants qui sont succédés depuis le début de la pandémie n'ont pas eu d'impact sur la capacité à détecter le SRAS-CoV-2 par TAAN. Quelques membres du comité PCR clinique ont émis de fortes réserves à abaisser le seuil pour la déclaration d'un résultat de faible quantité d'ARN détecté, d'autres ont trouvé le seuil proposé après discussion encore trop élevé, et certains ont proposé d'inscrire la valeur Ct obtenue sur le rapport.

Les seuils proposés dans le présent guide ont rallié une majorité de microbiologistes lors des discussions. La réflexion encadrant cette proposition de définition est exposée dans les lignes qui suivent.

L'INTERPRÉTATION DU CYCLE SEUIL (CT) LORS DE L'ANALYSE DE TAAN SARS-COV-2

Bien que l'analyse TAAN SRAS-CoV-2 soit une analyse qualitative, le cycle seuil (Cycle threshold ou Ct) obtenu pour un résultat positif est en général inversement proportionnel à la quantité d'ARN viral présent dans le spécimen.

En assumant que le spécimen a été prélevé de façon adéquate, qu'il a été conservé dans les meilleures conditions, et que la réaction d'amplification des acides nucléiques s'est produite telle qu'attendue (absence d'inhibition), un résultat positif avec un Ct élevé reflète qu'une faible quantité d'ARN viral se retrouve dans les voies respiratoires supérieures de la personne prélevée. Dans le cadre de dépistages **systematiques** chez des individus asymptomatiques **lors de l'admission en milieu de soins ou lors d'enquête élargis, par exemple**, les services de prévention des infections et les directions régionales de santé publique ont été confrontés à des situations dans lesquelles des individus avaient obtenu un résultat positif sans exposition récente au SRAS-CoV-2, et sans cas secondaires lors de l'enquête immédiate. Plusieurs de ces individus ont probablement une infection plus ancienne datant de plusieurs jours. **Selon les données empiriques obtenues auprès des centres qui font la détection du SRAS-CoV-2, ce phénomène est observé en plus forte proportion à la fin des vagues d'infection et entre les vagues épidémiques.**

En effet, les données issues de la littérature font état d'une durée d'excrétion médiane de 12 à 19 jours, et pouvant aller parfois jusqu'à 60 jours suivant une infection. Pour faciliter la gestion de ces cas par les cliniciens, il a été demandé de connaître la quantité relative d'ARN viral détectée dans le spécimen analysé par TAAN en laboratoire.

Un groupe français a démontré une corrélation inverse entre la valeur de Ct et la capacité à isoler le virus en culture avec absence de croissance virale au-delà de 34 Ct¹ (correspondance au nombre de copies/ml non mentionnée). Une autre équipe a publié sur l'absence de croissance en culture virale à partir de 8 jours après la survenue des symptômes, et a démontré une absence de croissance en culture cellulaire lorsque la concentration de copies d'ARN/ml était inférieure à 100 000 copies/ml.² Les CDC de Corée du Sud ont enquêté sur 285 cas d'excrétion virale prolongée³. Aucun cas n'a généré de cas secondaire. Sur 108 échantillons mis en culture, aucun n'a permis de mettre en évidence une capacité de réplication virale. Tous les échantillons avaient un Ct de plus de 25 et 89,5 % de ces échantillons avaient un Ct supérieur à 30 (corrélation inconnue avec les tests de laboratoire utilisés au Québec). **Depuis ce temps d'autres études ont mis en évidence une certaine corrélation inversement proportionnelle entre les valeurs de Ct et la contagiosité ainsi que la viabilité du virus dans les échantillons, une valeur de Ct élevée étant associée à la non-contagiosité ou la non-viabilité du virus lorsque les échantillons sont mis en culture⁴⁵. Une synthèse⁶ des**

1 La Scola, B.- Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. -Eur J Clin Microbiology and Infect Dis 2020.- 39:1059-1061

2 Wölfel, R.- Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.- Nature 28 may 2020, vol 581; pp 465-469.

3 <https://www.cdc.go.kr/board/board.es?mid=a30402000000&bid=0030>

4 Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis. 22 mai 2020.

5 Jaafar R, Aherfi S, Wurtz N, Grimaldier C, Hoang VT, Colson P, et al. Correlation between 3790 qPCR positives samples and positive cell cultures including 1941 SARS-CoV-2 isolates. Clin Infect Dis. Juin 2021.

6 Groupe des sciences émergentes. Synthèse en bref sur la charge virale et la probabilité de transmission pendant la période infectieuse du SRAS-CoV-2. Agence de la santé publique du Canada (ASPC) : Ottawa; mars 2021

connaissances en matière de charge virale et de contagiosité fait état de risque de transmission beaucoup plus significatif pour les charges virales supérieures à 1 000 000 copies/ml ou Ct < 30.

Inscrire la valeur de Ct sur le rapport peut être hasardeux étant donné la variabilité du résultat d'une trousse diagnostique à l'autre, la variabilité intrinsèque du résultat en présence d'une faible quantité d'ARN viral, et le fait que de fournir la valeur de Ct laisse la responsabilité de l'interprétation de cette valeur à l'intervenant qui reçoit le rapport. À la fin du printemps 2020, le comité clinique PCR du LSPQ a plutôt convenu d'inscrire sur le rapport lorsqu'une faible quantité d'ARN viral a été détectée, et d'accompagner ce résultat de commentaires d'interprétation. Cette information peut être utilisée, entre autres par les directions de santé publique, pour gérer les cas qui soulèvent un doute concernant leur contagiosité.

La définition harmonisée d'une faible quantité d'ARN viral était conservatrice en choisissant de façon empirique un seuil de 720 copies/ml ou moins. Les données scientifiques disponibles et l'expérience accumulée depuis le début de la pandémie supportent l'utilisation d'un seuil plus élevé. Il faut toutefois considérer que, lors de l'interprétation de la quantité d'ARN retrouvée dans un échantillon, les corrélations avec le potentiel de contagiosité ont été majoritairement⁷ effectuées avec des écouvillonnages nasopharyngés, et que certains prélèvements alternatifs (nez, salive, gargarisme) peuvent parfois pour un même patient récolter des quantités d'ARN plus faibles comparativement à l'écouvillonnage nasopharyngé⁸, et cette différence pourrait être encore plus marquée en comparaison avec l'écouvillonnage combiné de la gorge et du nasopharynx. Un nouveau seuil de 3600 copies d'ARN viral/ml est donc proposé, ce qui laisse de la latitude pour tenir compte d'une certaine variabilité des résultats (+/- 2 Ct^{9,10}) ainsi il y a encore une marge de manœuvre d'environ un log₁₀ en cas de résultats variant vers le haut. Ce changement est fait dans un contexte de passage d'une politique de santé publique d'élimination du virus à une politique de mitigation de la transmission, en présence d'un variant Omicron hautement transmissible, qui depuis son arrivée au Québec en décembre 2021 a causé une quantité importante d'infections discrètes à SRAS-CoV-2 ou symptomatiques, mais non confirmées par TAAN en laboratoire, faisant en sorte que plusieurs personnes pourraient actuellement présenter une excrétion résiduelle d'ARN viral secondairement à une infection plus ancienne et ne plus être contagieuses.

De multiples situations (autre qu'une ancienne infection avec excrétion prolongée d'ARN) peuvent occasionner des résultats avec une faible quantité d'ARN viral détectée (voir libellé plus bas), et il est recommandé de bien évaluer la situation ayant motivé le test de SRAS-CoV-2 ainsi que la probabilité pré-test de l'individu à avoir une infection récente et contagieuse. L'analyse d'un échantillon supplémentaire devra généralement être effectuée afin de vérifier la persistance l'évolution de la quantité d'ARN viral et donc la persistance de la faible quantité d'ARN viral, et une évaluation par l'intervenant de santé publique ou le clinicien est nécessaire avant de conclure qu'un résultat faiblement positif représente probablement une infection plus ancienne qui n'est plus non contagieuse. Un guide à l'intention des directions de santé publique pour la gestion de ce type de cas (Gestion des cas de COVID-19 présentant un premier test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) avec un résultat « détecté » ou « détecté faible quantité d'ARN viral » et de leurs contacts) peut être retrouvé à l'adresse suivante : <https://www.inspq.qc.ca/publications/3065-cas-test-amplification-acides-nucleiques-detecte-arn-covid19>

7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8052479/>

8 Réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et valeurs de cycle seuil (Ct) pour le dépistage de la COVID-19. Gouvernement du Canada. <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/2019-nouveau-coronavirus/document-orientation/reaction-chaîne-polymerase-valeurs-cycle-seuil-depistage.html>

9 Buchta C, Görzer I, Chiba P, Camp JV, Holzmann H, Puchhammer-Stöckl E, Mayerhofer M, Müller MM, Aberle SW. Variability of cycle threshold values in an external quality assessment scheme for detection of the SARS-CoV-2 virus genome by RT-PCR. Clin Chem Lab Med. 2020 Dec 16;59(5):987-994. doi: 10.1515/cclm-2020-1602. PMID: 33554519.

10 Rapport interne sur la limite de détection des différentes trousse de SRAS-CoV-2

DÉFINITION :

Une étude sur la limite de détection des différentes trousse diagnostiques a permis d'effectuer des comparaisons des valeurs numériques entre les méthodes, ce qui permet de proposer une définition harmonisée correspondant au résultat « **faible quantité d'ARN viral détectée** ». Les seuils proposés ici font en sorte que les échantillons contenant moins de **3600** copies/ml seraient rapportés comme **Détecté : faible quantité d'ARN viral détectée**.

	Définition (selon la valeur Ct des cibles)	Commentaire pour les responsables de laboratoire
Abbott RealTime	Ensemble des cibles ≥ 20	
Abbott Alinity	Ensemble des cibles ≥ 31	
Cobas 6800/8800	Ensemble des cibles ≥ 30	
Seegene Allplex	Cible N ≥ 32 ou absence de détection de 1 ou 2 cibles	
Cepheid Xpert	Ensemble des cibles ≥ 30	
LSPQ extraction chimique	Ensemble des cibles ≥ 31	
LSPQ lyse thermique	Ensemble des cibles ≥ 33	
Diasorin Simplexa	Ensemble des cibles ≥ 28	
Thermo Combo kit	Ensemble des cibles ≥ 26	
BD RidaGene	Cible E ≥ 30	Définition basée sur la monographie
BD SRAS-CoV-2	Ensemble des cibles ≥ 29	
Cobas Liat CoV-2 & Inf A/B	Ensemble des cibles ≥ 28	

En cas de grande discordance entre les résultats de différentes cibles ARN, envisager l'envoi au LSPQ pour étudier une possibilité de mutation d'une des cibles.

Une valeur de Ct supérieure ou un protocole de répétition de l'analyse peut être établi localement pour définir un résultat Équivoque.

RAPPORT :

Commentaires accompagnant le libellé « Détecté » dans le cas d'une faible quantité d'ARN viral détecté :

Une faible quantité d'ARN viral a été détectée. Les tests positifs avec une faible quantité de virus peuvent représenter :

- ▶ Un échantillon prélevé en tout début de la phase d'excrétion virale
- ▶ Un échantillon prélevé plusieurs jours ou semaines après l'infection
- ▶ Un échantillon mal prélevé ou mal conservé provenant d'un usager avec infection récente/contagieuse ;
- ▶ Un échantillon faussement positif (les TAAN utilisés au Québec sont extrêmement spécifiques, mais des résultats faussement positifs avec une faible quantité d'ARN viral détectée peuvent survenir très rarement en raison d'une contamination inter-échantillons).
- ▶ L'analyse d'un nouvel échantillon dans 24 à 72 h pourrait être envisagée si cliniquement indiquée.

Les corrélations cliniques avec les échantillons présentant une faible quantité d'ARN ont été majoritairement établies avec des échantillons nasopharyngés. Veuillez interpréter le résultat avec circonspection.

Résultat transmis à la direction régionale de santé publique du patient par le laboratoire.

Versions antérieures

Version	Date	Modifications
02	2022-05-09	►

Proposition de définition pour une faible quantité d'ARN viral détectée

AUTEURS

Judith Fafard, M.D., FRCP, microbiologiste-infectiologue, directrice médicale
Laboratoire de santé publique du Québec, Institut national de santé publique du Québec

Jeannot Dumaresq MD FRCPC
Microbiologiste infectiologue, CISSS DE Chaudière-Appalaches

COLLABORATEURS

Remerciement : Merci à Donald Murphy, à l'origine des travaux qui ont permis l'harmonisation des valeurs CT des différentes technologies.

RÉVISEURS

Anne Bruneau MD MSc FCMC
Direction des risques biologiques, Institut National de Santé Publique du Québec

Agnès Depatureaux-Gérémy, MD, PhD
Microbiologiste infectiologue, CISSS Lanaudière

MISE EN PAGE

Danka Kareen Shank, agente administrative
Laboratoire de santé publique du Québec, Institut national de santé publique du Québec

N° de publication :

Ce document est disponible intégralement en format électronique (PDF) sur le site Web de l'Institut national de santé publique du Québec au : <http://www.inspq.qc.ca>.

Les reproductions à des fins d'étude privée ou de recherche sont autorisées en vertu de l'article 29 de la Loi sur le droit d'auteur. Toute autre utilisation doit faire l'objet d'une autorisation du gouvernement du Québec qui détient les droits exclusifs de propriété intellectuelle sur ce document. Cette autorisation peut être obtenue en formulant une demande au guichet central du Service de la gestion des droits d'auteur des Publications du Québec à l'aide d'un formulaire en ligne accessible à l'adresse suivante : <http://www.droitauteur.gouv.qc.ca/autorisation.php>, ou en écrivant un courriel à : droit.auteur@cspq.gouv.qc.ca.

Les données contenues dans le document peuvent être citées, à condition d'en mentionner la source.

© Gouvernement du Québec (2021)