



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.



Détection en temps réel sur LightCycler 480 II Criblage de mutations dans le gène S du SARS-CoV-2

Auteur(s) : Cynthia Massé

Réviser(s) : Marc-Christian Domingo

Approbateur : Marc-Christian Domingo

Coordonnateur du document : Mélanie Pilote

1. Préambule

Ce document est une nouvelle procédure.

2. Objet

Ce document vise à décrire la procédure à suivre pour effectuer la détection de variants du SARS-CoV-2 portant des mutations dans le gène S (Spike protein) dans des spécimens cliniques provenant de prélèvements nasopharyngés ou par gargarisme.

Dans le contexte de pandémie à la COVID-19, devant l'émergence de plusieurs variants de la souche originale de SARS-CoV-2 et l'apparition constante de nouvelles mutations, le besoin de détecter les types de variants, dont certains sembleraient plus contagieux, devient un enjeu de santé publique important afin de : i) contenir le plus rapidement possible les éclosions dues aux variants, ii) surveiller leur évolution et leur prédominance dans la population, iii) établir les liens épidémiologiques; iv) fournir de l'information permettant d'évaluer l'efficacité des différents vaccins.

3. Champs d'application

Ce document est destiné au personnel des secteurs Identification bactérienne-Biologie moléculaire et Biologie moléculaire.

4. Définition des termes

Se référer à LI-GQ-016 version électronique du secteur Gestion de la qualité.

5. Principes

Criblage de mutations offert :

- Détection de la mutation N501Y : si présence de la mutation 501Y, indication du variant Britannique (UK B.1.1.7) ou Sud-Africain (B.1.351) ou Brésilien (B.1.1.28).
- Détection de la délétion 69-70 : si présence de la délétion, indication du variant Britannique (UK B.1.1.7).
- Détection de la mutation E484K : si présence de la mutation 484K, indication du variant Sud-Africain (B.1.351) ou Brésilien (B.1.1.28).
- Détection de la mutation L452R : si présence de la mutation 452R, indication du variant Californien B.1.429

Étant donné que ces mutations pourraient être décrites chez d'autres variants, il serait prudent d'interpréter les résultats des mutations selon le contexte épidémiologique de propagation des variants.

6. Spécimen

- **Extraits d'ARN purifiés** (selon une méthode validée au LSPQ) obtenus à partir de prélèvements nasopharyngés ou gargarisme (criblage seulement)
- **Contrôle négatif** : Eau de la trousse de réactifs LightCycler® Multiplex RNA Virus Master
- **Contrôle positif d'amplification**: Contrôle positif associé à la trousse de criblage réhydraté dans 320 µL d'eau de la trousse de réactifs.

7. Matériel requis

A) Matériel

- Plaques à réaction « LightCycler 480 Multiwell plate 96 white »
- Scellant pour plaque à réaction « LightCycler 480 Sealing foil » ou équivalent, de qualité optique
- Portoir pour plaque à réaction 96 puits
- Tubes de 1,5 mL ou 2 mL à bouchon vissé
- Portoirs pour tubes de 1,5 mL et 2 mL
- Micropipettes
- Embouts tamponnés stériles
- Récipients pour matériel contaminé de type « conocup » et « pipet keeper »

B) Réactifs

- LightCycler® Multiplex RNA Virus Master
- Mélange d'amorces et de sonde pour chacune des cibles :
 - Mutation N501Y: VirSNIp SARS-CoV-2 Spike N501Y
 - Mutation del69/70 : VirSNIp SARS-CoV-2 Spike del H69/V70
 - Mutation E484K: VirSNIp SARS-CoV-2 Spike E484K
 - Mutations en duplex: VirSNIp SARS B1117 (Spike del+501)
 - Mutation L452R : VirSNIP SARS-CoV-2 Spike L452R

8. Équipement

- Mélangeur de type vortex
- Enceinte close avec lampe UV
- Micro-centrifugeuse pour tubes de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse à plaques
- LightCycler 480 II de Roche©

9. Contrôle de la qualité

- Vérifier et respecter les dates de péremption des réactifs;
- Vérifier et respecter la date de contrôle de l'appareil;
- Se référer au *Guide des bonnes pratiques de laboratoire en IDBM (GU-IDBM-001)* pour le comportement général dans les locaux.

10. Précautions spéciales

- ❖ Utiliser le marqueur le plus discrètement possible, et seulement sur les côtés de la plaque, afin de ne pas nuire à la lecture dans l'appareil;
- ❖ Éviter de toucher le scellant de la plaque aux endroits de lecture;
- ❖ Toujours centrifuger la plaque avant la lecture dans l'appareil pour éliminer les bulles au ménisque (l'appareil effectue la lecture de la fluorescence au ménisque).

11. Exposé de la procédure

1. Compléter le registre de travail associé à la procédure;
2. Au local Post-PCR :
 - Ouvrir l'appareil LC480 II et le logiciel et cliquer sur «New experiment from template»;
 - Sélectionner le gabarit : SNP-SARSCOV
3. Enregistrer le fichier dans le dossier EXPERIMENTS/VARIANTS-COVID-ROUTINE selon la nomenclature AAAA/MM/JJ-nom de la mutation;
4. Vérifier que les paramètres du programme PCR sont exacts;
5. Sous l'onglet « Subset editor », créer un nouveau « subset » avec les positions occupées seulement;

6. Sous l'onglet « Sample editor », sélectionner « Abs Quant », sélectionner le « subset » créé et éditer les numéros de spécimens; imprimer le schéma de plaque en cliquant sur « Toggle view (Table) » et avec l'outil de capture d'écran.
7. Au local des réactifs, procéder au mélange réactionnel selon le registre associé.
8. Homogénéiser le mélange réactionnel au vortex à puissance maximale pendant quelques secondes, puis centrifuger brièvement.
9. Distribuer **10 µl** de mélange réactionnel dans les puits sélectionnés.
10. Au local pré-PCR, déposer **10 µl** d'extrait d'ARN purifié, préalablement centrifugé et mélangé, de chaque échantillon et contrôle. S'assurer de la correspondance entre la numérotation des échantillons sur le registre et le schéma de la microplaque.
11. Couvrir la microplaque d'un scellant de qualité optique spécifique à l'appareil.
12. Déposer la plaque dans l'appareil LC4800 II et démarrer l'analyse.

12. Résultats

- A) Lorsque l'analyse est terminée, cliquer sur l'onglet « Analysis » et choisir l'analyse 'Tm calling' et ensuite 'calculate'.
- B) Avertir le professionnel en charge que l'analyse est disponible pour l'émission des résultats.

13. Interprétation des résultats

Pour chaque spécimen, analyser les courbes des températures de dissociation et les interpréter selon les recommandations du manufacturier. Les courbes atypiques devront être interprétées avec circonspection et au besoin, le spécimen séquencer.

Mutation N501Y	Tm (°C) LC480	Mutation del69-70	Tm (°C) LC480
Souche sauvage 501N (WT)	55 – 57	Souche sauvage (WT)	57-59
N501Y	60 – 62	del69-70	63-66

Mutation duplex N501Y/del69-70	Tm (°C) LC480	Mutation E484K	Tm (°C) LC480
Souche sauvage 501N (WT)	48,5±2	Souche sauvage 484E (WT)	52-55
501Y	54,7±2	484K	56-58
del69-70	60±2	484Q	48-51

Mutation L452R	Tm (°C) LC480
Souche sauvage L452 (WT)	48-51
452R	56-58
453F	44-46

14. Limites de la méthode

La validation de la méthode a démontré une limite de détection pour chaque trousse décrite ci-bas :

Mutations N501Y, del H69/V70 et duplex del+501 : détection jusqu'à 100 copies par μl (dilution 10^{-4})

Mutation E484K : détection jusqu'à 1000 copies par μl (dilution 10^{-3})

La limite de la méthode pour chaque trousse a été établie à l'aide des standards Britannique, Sud-Africain et Brésilien de la compagnie Twist Bioscience (Standards purs concentrés à 1 million de copies/ μl).

15. Guide de dépannage

Se référer à la procédure d'utilisation en vigueur du LightCycler 480 II de Roche© pour la manipulation de l'appareil et le manuel du fabricant.

16. Enregistrement des données

Chaque analyse est enregistrée dans le dossier informatique dédié. Le secteur Identification bactérienne-Biologie moléculaire a la responsabilité d'informer le professionnel responsable lorsque l'analyse est terminée et ce dernier est responsable de la gestion des résultats qui s'en suit. Ces résultats sont transmis au professionnel responsable du dossier SGIL à l'aide d'un fichier excel.

17. Références

- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike N501Y Cat.-No. 53-0780-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike del H69/V70 Cat.-No. 53-0781-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS-CoV-2 Spike E484K Cat.-No. 53-0789-96
- Manuel d'utilisation VirSNiP SARS B117 (Spike del+501) Cat.-No. 53-0790-96
- Manuel d'utilisation VirSNIP SARS CoV-2 Spike L452R Cat-No. 53-0793-96

- LightCycler® 480 Probes Master. Version June 2005
- Présentation du système LightCycler® 480. Auteur : Laurent Acoca M. Sc. A

18. Documents associés

RE-IDBM-186	Détection de mutations du SARS-CoV-2 sur LC480
PR-IDBM-065	Guide d'utilisation du LightCycler 480 II de Roche©

Annexe 1 Mélanges réactionnels et protocoles PCR

Réactifs	Volume par réaction	Volume total
Eau de la trousse	5.4 µl	
Amorces et sonde (bouchon jaune)	0.5 µl	
Master Mix	4,0 µl	
RT enzyme	0,1 µl	
Volume à distribuer	10 µl	
Volume d'ARN	10 µl	
Volume total	20 µl	

	Mode	Température	Durée	Cycle	Ramp rate
Amplification	RT	55 °C	5 min.	1	4,4
	Dénaturation	95 °C	5 min.	1	4,4
	Cycles	95°C	5 sec.	45 cycles	4,4
		60°C	15 sec.		2,2
72°C		15 sec.	4,4		
Melting curve		95°C	30 sec.	Acquisition mode : continuous Acquisitions [per °C] : 3 Melting slope : entre 0.19 et 0.29 °C/s	4,4
		40 °C	2 min.		1,5
		75 °C	0:00 minute		N/A
Refroidissement		40 °C	30 sec.	N/A	1,5