



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



INOCULATION DE SPÉCIMEN POUR LA CULTURE DE VIRUS SARS-CoV-2

Noms

Auteur(s) : Carole Dagenais

Réviser(s) : Sylvie Nancy Beaulac

Approbateur : Hugues Charest

Coordonnateur du document : Sylvie Nancy Beaulac

Cette page se veut intentionnellement sans texte

I. PRÉAMBULE

Ceci est un nouveau document créé comme guide pour l'inoculation en culture de SARS-CoV-2 détectés par PCR dans des échantillons cliniques, ou à partir de lignées cellulaires infectées afin d'amplifier le nombre de particules virales.

II. OBJET

Ce document vise à décrire la technique employée pour inoculer une lignée cellulaire à partir de spécimens respiratoires prélevés ou à partir de lignées cellulaires infectées afin d'amplifier le nombre de particules virales.

III. OBJECTIFS

Cette technique permet de mettre en évidence le caractère contagieux de particules de SARS CoV-2 par l'observation d'un effet cytopathique.

IV. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Sérodiagnostic et virologie ayant reçu une formation en NC3 adéquate et documentée, ainsi qu'une formation en culture cellulaire. Cette procédure s'applique aux spécimens reçus pour le diagnostic d'une infection par le virus respiratoire SARS-CoV-2.

V. DÉFINITIONS DES TERMES

ECP : Effet cytopathique

VI. PRINCIPE

L'inoculation de spécimen permet lorsqu'il y a présence de virus de fixer ces derniers sur la paroi cellulaire. Les virus une fois adsorbés pénètrent dans la cellule pour se multiplier. Cette multiplication virale permet généralement d'observer un ECP dans la lignée de cellule VeroE6 lorsque plusieurs cycles de répliquations détruisent les cellules infectées.

VII. SPÉCIMEN

Les spécimens sont de nature respiratoire ou peuvent provenir de cultures cellulaires.

VIII. MATÉRIEL REQUIS

Matériel :

- Tube à centrifugation de 15 ml ou de 50 ml
- Pipettes sérologiques de 1, 5 et 10 ml
- Vial pour culture cellulaire (#5900239 ou équivalent)
- Flacon (F25)
- Pipettes de transfert stériles
- Incubateur (36 – 38°C) avec 5% de CO₂
- Micropipette de 10 à 100 µL et embouts stériles
- Micro tubes stériles 2,0ml Sarstedt #cat 72.693.005 ou équivalent
- Vortex

Réactifs :

- Solution de PBS - influenza pH 7,5
- Milieu de maintien utilisé pour l'inoculation des spécimens (milieu DMEM, glutamine, HEPES, GVF 100X – gentamycine, vancomycine, fungizone – et sérum fœtal bovin. Voir le registre RE-VR-003 et le modifier avec l'ajout de GVF 100X au lieu de gentamicine
- Cellules VeroE6 en culture

IX. ÉQUIPEMENT (entretien et vérification)

Les appareils utilisés sont vérifiés et entretenus en fonction de leur procédure respective.

X. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Chaque analyse doit inclure un contrôle interne négatif – vial de cellules non infecté.

Un contrôle positif doit être inclus à l'utilisation d'un nouveau lot de cellules – portion aliquote adéquate de contrôle positif interne.

XI. PRÉCAUTIONS SPÉCIALES

Toute manipulation avec des cultures cellulaire infectées avec des échantillons de patients potentiellement positifs pour le virus SARS CoV-2 doit être effectuée sous une ESB en **NC3**.

XII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

1) Inoculation en vial :

Préparation des vials en NC2

- Laver les cultures de cellules avec du PBS pH 7,5 stérile préchauffé à 36 - 38°C (2,0 mL pour un vial).
- Ajouter 2,0 ml de milieu de maintien préchauffé à 36 - 38°C.
- À cette étape, ajouter 100µL de milieu dans le témoin négatif.
- Vortexer les échantillons et les placer dans une mallette pour le transfert en NC3.

*Transférer les portoirs de vials et échantillons en **NC3** pour faire l'inoculation*

- Ajouter 100µL de l'échantillon à analyser (au besoin incliner les tubes).
- Prendre soin de dévisser légèrement les tubes.
- Incuber le portoir de vials à 36 – 38°C avec 4,0-6,0% de CO₂.

Si possible, effectuer une lecture journalière des cultures pendant 10 jours et inscrire les résultats de l'observation du feuillet cellulaire dans le registre qui sera numérisé et envoyé à votre poste de travail.

Au besoin, si le milieu devient acide (jaunâtre) ou si le feuillet du témoin négatif dégénère, au jour 5 jours ± 2 retirer environ 1,0 mL de milieu pour le remplacer par du milieu frais.

Note : Reprendre l'inoculation du spécimen s'il y a présence de contamination.

2) Inoculation avec culture cellulaire en flacon (F25)

- Diluer l'échantillon au besoin avec du milieu de maintien DMEM. (ex.100 µL culture + 900µL DMEM)
- Laver les cultures de cellules avec 5,0 mL de PBS pH 7,5 stérile.
- Ajouter environ 1,0 mL d'échantillon (possiblement dilué) à analyser.
- Incuber à 36 - 38°C pour 60 minutes à 4,0 - 6,0% de CO₂ en agitant à toutes les 20 minutes.
- Ajouter le milieu de maintien (ex: 9,0 mL pour les flacons de culture de 25 cm²).
- Incuber un flacon de cellules non infectées qui servira comme contrôle négatif.
- Incuber à 36 - 38°C à 4,0 à 6,0% de CO₂ en dévissant légèrement les flacons de culture.

Si possible, effectuer une lecture à tous les jours pendant 10 jours et inscrire ces résultats dans le registre.

Au besoin, au jour 5 ± 2, faire un changement de milieu de maintien si le milieu devient acide ou le feuillet du témoin négatif dégénère. Retirer 7,0 ml de milieu et en ajouter l'équivalent.

Note : Reprendre l'inoculation du spécimen s'il y a présence de contamination.

Au besoin, effectuer le test PCR avec les spécimens analysés

XIII. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Un résultat positif est exprimé par un ECP. Généralement l'échelle utilisée est de 1+ à 4+ (1+ étant un ECP très faible). Quand l'ECP est de 3 à 4+, il reste moins de 25% de cellules encore adhérentes au vial ou flacon et l'échantillon est considéré positif. Récolter le surnageant et le distribuer dans des tubes Sarstedt ou cryotubes à raison de 1,0 ml/tube qui seront entreposés dans le congélateur au NC3 à -70°C.

Bien identifier les tubes en inscrivant le numéro d'identification du spécimen, et autres informations possiblement pertinents - la date de récolte, la journée post-infection.

S'assurer de mettre à jour le registre d'inventaire de placement des échantillons dans le congélateur tombeau à -70°C disponible dans le cartable au local 1.253 et aussi dans S : partage/virologie/congélateur NC3 (-70) #3124.

Noter qu'un spécimen est négatif après 10 jours si aucun ECP n'est observé en culture. Le spécimen est alors jeté ou conservé si il devient pertinent d'effectuer d'autres analyses sur le surnageant.

XIV. LIMITES DE LA MÉTHODE

Un résultat négatif n'exclut pas la présence de virus dans le spécimen clinique.

Un effet cytopathique (ECP) n'est pas nécessairement relié à une propagation du virus CoV-2, il peut être causé par la présence d'un autre virus ou être dû à un effet cytotoxique.

XV. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Inscrire et numériser les résultats au registre "Inoculation d'échantillons pour virus Respiratoire".

XVI. RÉFÉRENCES

Modification de la procédure utilisée au LSPQ pour l'inoculation de virus respiratoire (Influenza).

Abstract publié 2020-03-11 : CDC Volume 26, Number 6 – June 2020 (ISSN :1080-6059)