


Institut national de santé publique Québec  Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)	
	Secteur : IDBM	
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5		VERSION 1.0 2021-02-11

Rédigé par :	Cynthia Massé
Révisé par :	Marc-Christian Domingo

1. Objet

Ce document décrit la méthode de détection de la mutation N501Y sur les variants SRAS-CoV-2 avec la trousse VirSNIp SARS-CoV-2 Spike N501Y de Roche :

- 1) Protocole de Roche avec la trousse LightMix sur le thermocycleur LC480 II
- 2) Protocole de Roche avec la trousse LightMix sur le thermocycleur QuantStudio 5 de ABI

2. Principe

Le protocole d'amplification par RT-PCR cible la séquence nucléotidique du gène S codant pour une glycoprotéine et portant la mutation N501Y (position A23063T dans le gène S). Les extraits d'acides nucléiques sont préparés à l'aide d'une plateforme d'extraction permettant une purification des acides nucléiques. Deux plateformes d'amplification sont validées au LSPQ avec le LightMix de Roche : LightCycler LC480 II et QuantStudio 5 de Applied Biosystem. Cette trousse peut également s'utiliser avec les instruments CFX96 de Biorad selon le manuel du fabricant. Possiblement que des thermocycleurs pouvant lire un signal en FAM et faire une réaction pour mesurer les profils de fusion (melting curve) seront compatibles avec l'utilisation de cette trousse.


En résumé, il s'agit d'une première réaction d'amplification de type RT-PCR, suivie d'une réaction d'analyse des profils de fusion (melting curve) avec une sonde non hydrolysée en fin d'élongation (de type SimpleProbe). Durant la phase RT-PCR, il n'y a normalement pas (LC480) ou peu (QS5) de signal d'amplification en temps réel pour le virus sauvage, car la température d'hybridation de 60 °C des sondes lors de l'amplification ne permet que la détection du signal du variant N501Y.

3. Spécimens

Utiliser des extraits d'acides nucléiques purifiés. L'utilisation d'extraits bruts d'acides nucléiques obtenus par lyse thermique sans une étape de purification devra être validée auparavant avec ce protocole.

4. Matériel requis

- Plateforme d'extraction automatisée (ou semi-automatisée) d'acides nucléiques de votre choix
- Thermocycleur LightCycler LC480 II
- Thermocycleur QuantStudio 5 (ou autre version permettant d'y programmer une étape de melting curve).

Institut national de santé publique Québec  Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)	
	Secteur : IDBM	
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5		VERSION 1.0 2021-02-11

5. Protocole avec la trousse Lightmix de Roche sur LC480 II et QuantStudio 5 de ABI

5.1. Cibles et sondes

Les séquences des amorces et sondes de la trousse LightMix sont inconnues.

Cibles	Format de détection sur LC 480 II	Détection sur QS5
S gene, N501Y mutation	Canal (465-510) ; FAM	Experiment type : Melt Curve Chemistry: SYBR Green Target: FAM (NFQ-MGB) ROX : none

5.2. Trousses et numéros de catalogue des réactifs du LightMix de Roche

Catalogue #	TIB LightMix amorces et sondes	Format	Contenu
09405577001	SARS Spike N501Y	96	Amorces, sonde et contrôle positif lyophilisés à T°C pièce
Catalogue #	Mastermix	Format	
07083173001	LightCycler® Multiplex RNA Virus Master	1000	qPCR mix RT solution Eau

5.3. Mélange réactionnel pour RT-PCR


Voir la procédure du manufacturier pour la reconstitution des amorces et sondes lyophilisées

À titre indicatif

Reconstitution des amorces et sondes		
Réactifs lyophilisés	Volume	Concentration
LightMix SARS Spike N501Y	50 µl d'eau de la trousse de réactifs	Inconnue. Chaque tube permet 96 réactions au total.
Contrôle positif	320 µl d'eau de la trousse réactifs (si on utilise 10 µl par réaction)	Inconnue. Chaque tube permet 32 réactions au total.

À partir des réactifs reconstitués, préparer le mix pour la réaction RT-PCR :

Préparation du Mastermix et de la réaction RT-PCR	
Réactifs par réaction	Volume par réaction

Institut national de santé publique Québec  Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)
	Secteur : IDBM
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5	VERSION 1.0 2021-02-11

Eau PCR grade	5,4 µl
LightMix SARS Spike N501Y	0,5 µl
qPCR reaction mix 5X (LightCycler® Multiplex RNA Virus Master)	4,0 µl
RT solution	0,1 µl
Volume de mastermix à distribuer	10 µl
Extrait purifié d'acides nucléiques (spécimens) OU contrôle positif OU contrôle négatif (eau)	10 µl
Volume total	20 µl

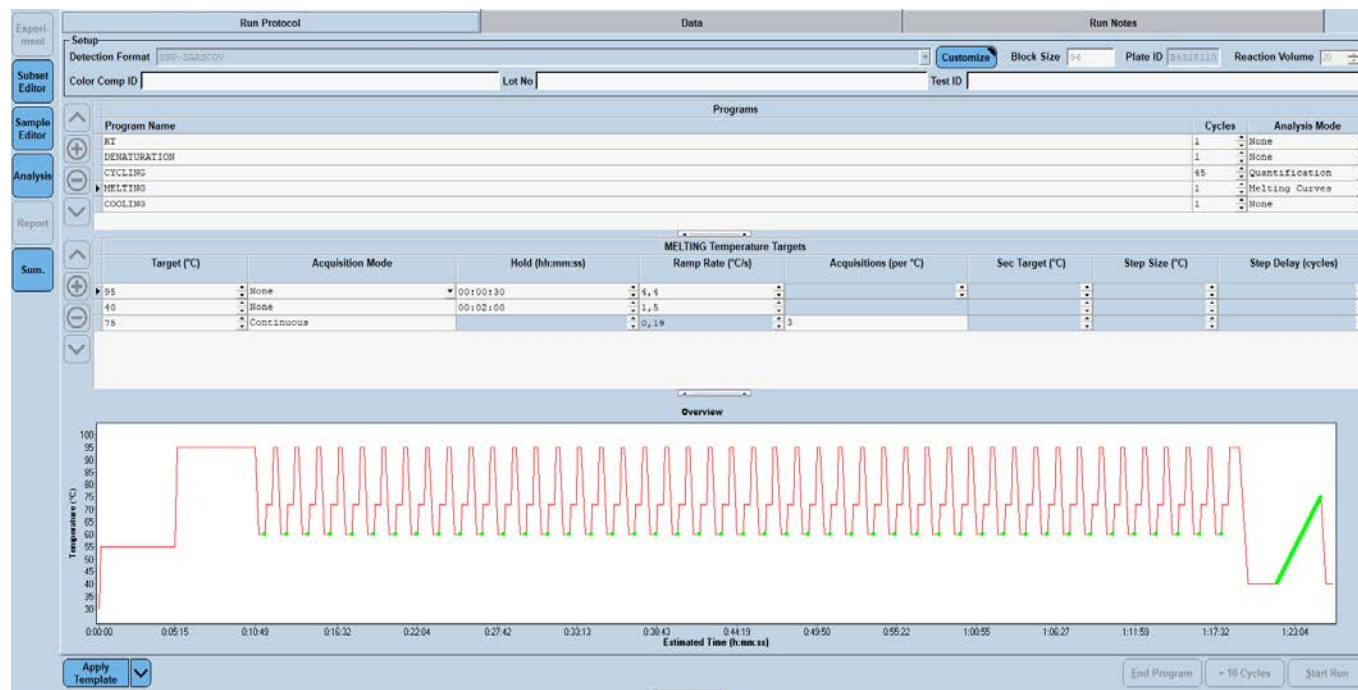
N. B. Utiliser les plaques de réaction recommandées par le fabricant de l'appareil, i.e. les plaques blanches opaques vendues par Roche pour le LC480 II et les plaques translucides ABI ou équivalent pour le QuantStudio 5.

5.4. Programme RT-PCR sur le LC480 II (voir figure 1)

	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

Institut national de santé publique Québec Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)
	Secteur : IDBM
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5	VERSION 1.0 2021-02-11

Figure 1 : Illustration du programme PCR sur LC480 II



5.5. Programme RT-PCR sur le QuantStudio 5 (voir figure 2)

	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
Melting curve	72°C	15 sec.		4,4	
	95 °C	30 sec.	Acquisition: continuous Melting slope: inscrire 0.19 °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	

Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y :
 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II
 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5

VERSION 1.0
 2021-02-11

Figure 2 : Illustration du programme PCR sur QS5



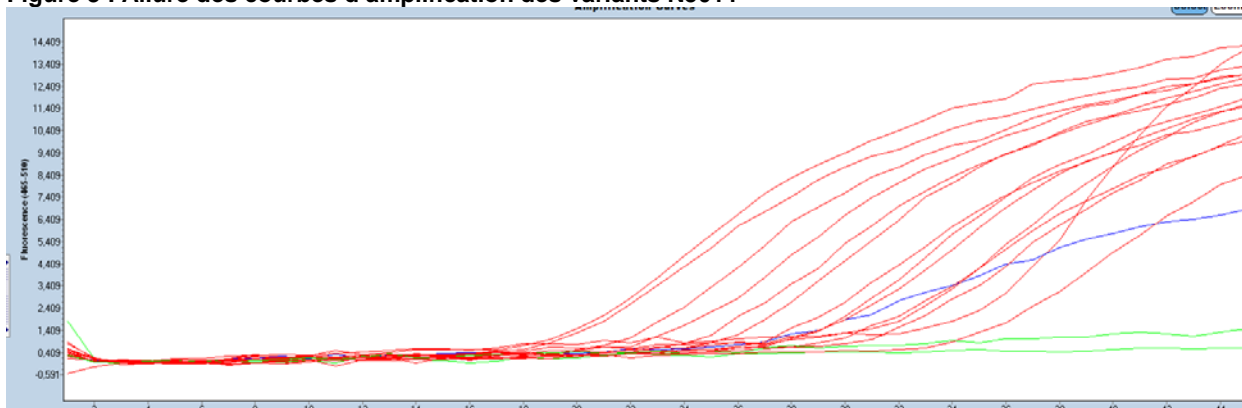
Institut national de santé publique Québec Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)
	Secteur : IDBM
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5	VERSION 1.0 2021-02-11

6. Extraction et interprétation des résultats

LC480 II

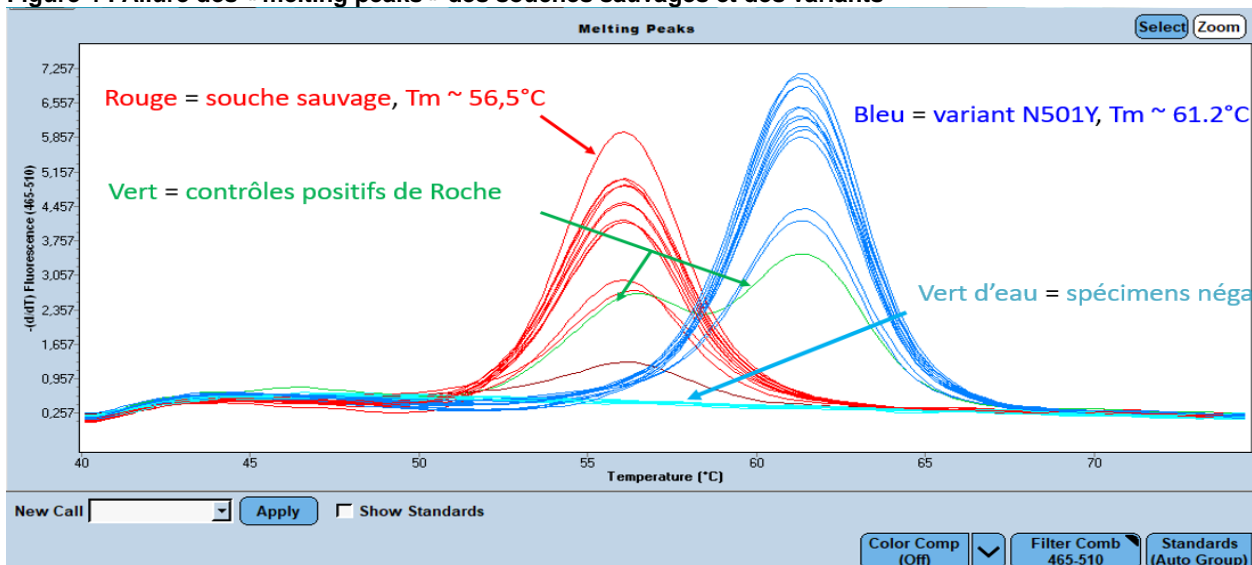
- A) Pour visualiser les courbes d'amplification des variants N501Y, faire une analyse en 2^e dérivée ;
- B) Effectuer l'analyse « Tm calling » et imprimer ou exporter le rapport d'analyse selon votre procédure (l'analyse « melting curve genotyping » ne permet pas d'extraire les données de températures de fusion des spécimens) ;

Figure 3 : Allure des courbes d'amplification des variants N501Y



Aucune amplification n'est visible pour les spécimens sauvages (en vert)

Figure 4 : Allure des « melting peaks » des souches sauvages et des variants



Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y :

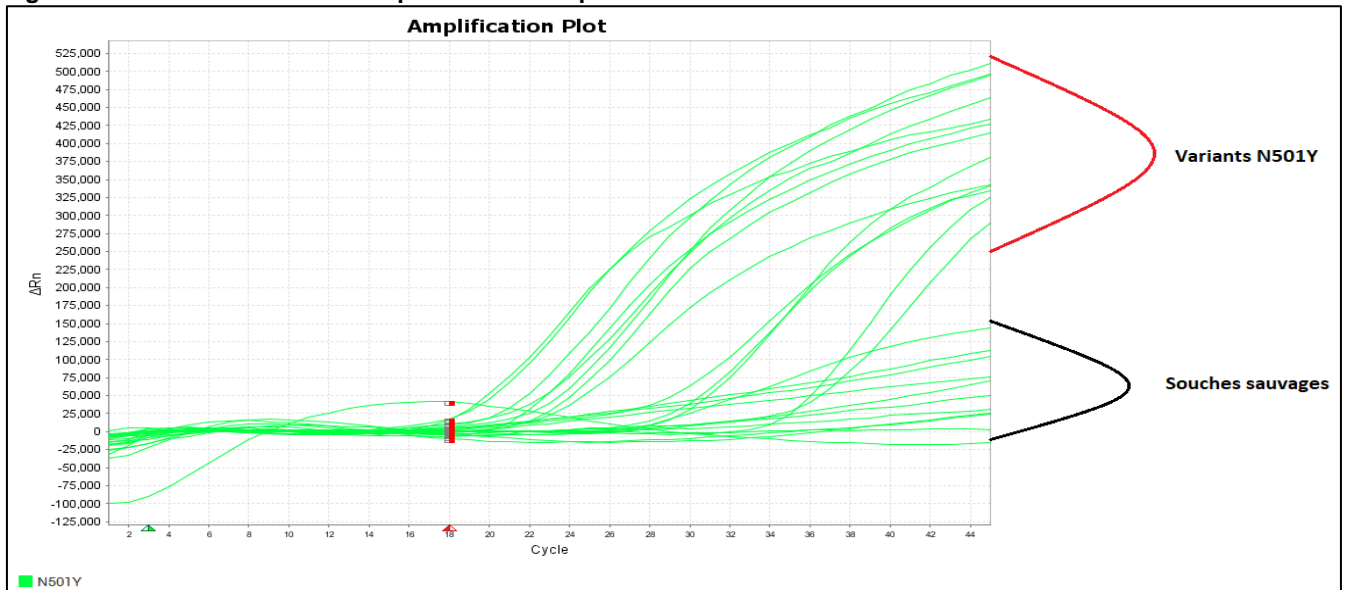
- 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II
- 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5

VERSION 1.0
2021-02-11

QuantStudio 5

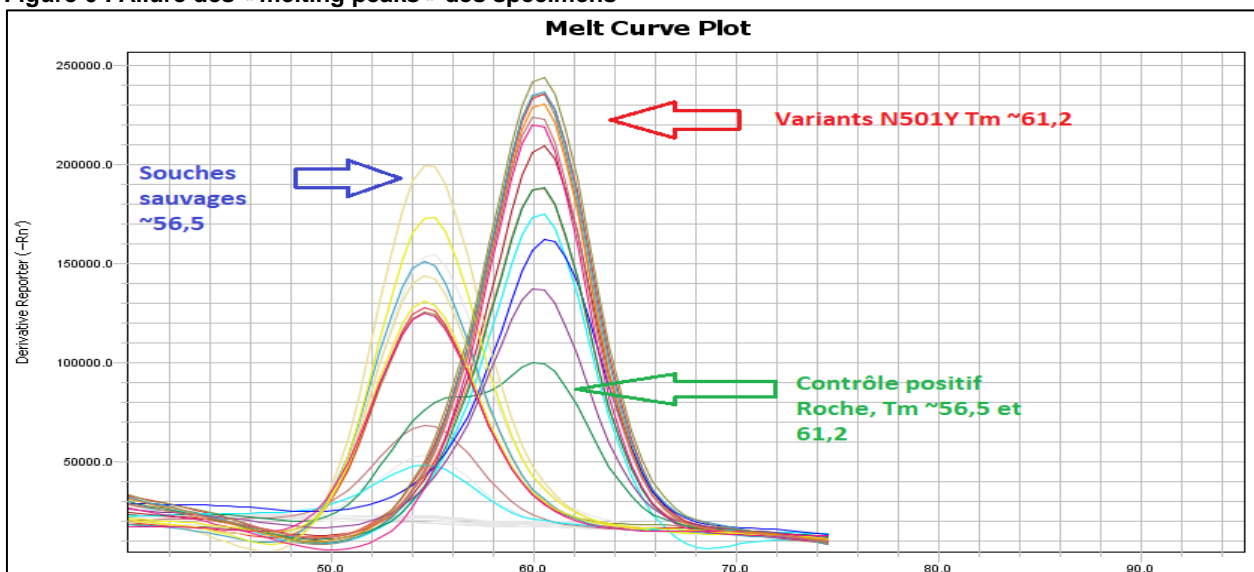
- A) Sélectionner « melt curve plot » sous l'onglet des résultats ;
- B) Imprimer ou exporter le rapport d'analyse selon votre procédure.


Figure 5 : Allure des courbes d'amplification des spécimens



Une légère amplification des souches sauvages est visible.

Figure 6 : Allure des « melting peaks » des spécimens



Institut national de santé publique Québec  Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)
	Secteur : IDBM
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5	VERSION 1.0 2021-02-11

Interprétation des résultats

Échantillons	Amplification	Melting ¹	Résultat
Contrôle négatif	aucune	Aucun pic	valide
	Aucune ou présence	Présence de pics	Contamination, analyse à reprendre
Contrôle positif	oui	Doubles pics à ~ 56,5 °C ± 2 et ~ 61,2 °C ± 2	valide
	non	Aucun pic ou seulement à ~ 56,5 °C ± 2	Non-valide, analyse à reprendre
Spécimens	oui	Pic ~ 56,5 °C ± 2	Souche sauvage
		Pic à ~ 61,2 °C ± 2	Variant N501Y
	Aucune (légère amplification pour QS5)	Pic à plus ou moins ~ 56,5 °C ± 2	Souche sauvage

¹ Se référer à la température spécifique validée par la compagnie Roche pour chaque lot de LightMix SARS Spike N501Y qui est inscrite dans l'encadré « Certificate of Analysis » sur chaque monographie qui accompagne le produit.

7. Rapport d'analyse

Conclusion à inscrire au rapport d'analyse pour la recherche de variants N501Y à l'aide du test de Roche :

a) Variant N501Y détecté

Résultat : mutation N501Y détectée

Interprétation :

Mutation associée à un variant SARS CoV-2 à surveillance rehaussée.

La trousse VirSNip SARS-CoV-2 Spike N501Y de Roche n'est pas approuvée par Santé Canada.

b) Variant N501Y non-détecté


Résultat : mutation N501Y non détectée

Interprétation :

Absence de variants avec mutation N501Y.

Ce résultat n'exclut pas la présence d'une autre mutation associée à un variant SARS CoV-2 à surveillance rehaussée.

La trousse VirSNip SARS-CoV-2 Spike N501Y de Roche n'est pas approuvée par Santé Canada.

Institut national de santé publique Québec  Laboratoire de santé publique du Québec	PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)
	Secteur : IDBM
Protocole de détection de variants SRAS-CoV-2 portant la mutation N501Y : 1) Trousse LightMix de Roche sur LC480 II 2) Trousse LightMix de Roche sur QuantStudio 5	VERSION 1.0 2021-02-11

Annexe

Caractérisation des différents variants selon les différentes mutations recensées (à titre indicatif en date de ce jour)

Mutation dans la protéine Spike	Mutation dans le gène S	UK B.1.1.7	Afr. du Sud B.1.351 ; 501.V2	Brésil B.1.1.28	Nigeria	Danemark (visons)	Fonction
N501Y	A23063T	X	X	X			RBD (stronger ACE binding)
delHV69/70	del21765-770	X				X	Évasion de la réponse immunitaire
D614G	A23403G	X	X		X	X	RBD (stronger ACE binding)
Y453F	A22920T					X	RBD (weaker ACE binding)
K417N	G22813T		X				RBD (ACE binding domain)
N439K	C22879A						ACE binding, évasion immunitaire
E484K	G23012A		X	X			RBD (ACE binding domain)
P681H	C23604A	X			X		Site de clivage de la furine

Références- Vidéos

1) Comment programmer VirSNiP sur le LC480

[Lien pour télécharger la vidéo : Comment programmer VirSNiP sur le LC480 \(MP4\)](#)

2) VirSNiP Simple Probe concept

[Lien pour télécharger la vidéo : VirSNiP Simple Probe concept \(MP4\)](#)

© Tous droits réservés - ROCHE