

# Tests COVID-19 par RT-qPCR

## 1 OBJECTIF

Ce mode opératoire décrit :

- **la partie technique** : conditions à mettre en œuvre pour réaliser une réaction de Reverse Transcription - PCR en temps réel en une étape (RT-qPCR 1 STEP) sur des extraits d'ARN viraux
- **la partie médicale** : interprétation des résultats et circuit du compte-rendu

## 2 DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à la réalisation des tests COVID-19 à partir d'ARN viraux extraits avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini.

## 3 PERSONNEL CONCERNÉ

Personnel technique et médical du département de BioPathologie.

## 4 DOCUMENTS ASSOCIÉS

- PAM-PROC-0016 : Gestion du travail technique dans le SIL Ariane en Pathologie Moléculaire
- PAM-FITC-0009 : Réception, Préparation et stockage des réactifs de PCR, amorces et sondes
- PAM-MOP-0094 : Extraction ARN QIAamp Viral RNA Mini kit – Qiagen
- PAM-FQ-0271 : Série extraction ARN QIAamp Viral RNA Mini kit – Qiagen
- PAM-FQ-0272: Feuille de travail RT-PCR COVID-19
- PAM-MOP-0014 : Réaction de PCR
- PAM-MOP-0089 : Utilisation du QuantStudio 5
- PAM-MOP-0090 : Analyse des résultats de RT-PCR
- PAM-FQ-0004 : Plan de plaque 96 puits

## 5 EQUIPEMENT, MATÉRIEL UTILISÉ

### 5.1 Matériel

Matériel	Fournisseur	Référence	Stockage
Boîte de cônes ART 1000	Dutscher	038029	Pièce réserve Et3.d
Boîte de cônes ART 200	Dutscher	038019	Pièce réserve Et3.d
Boîte de cônes ART 20	Dutscher	038009	Pièce réserve Et3.c
Boîte de cônes ART 10	Dutscher	038001	Pièce réserve Et2.d
Gants latex ou vinyle	Magasin	/	Pièce réserve Et2.b
Pipettes P1000/200/20/10	Gilson	/	Labo Pré-PCR / Poste ARN du LaboG
Bac à glace ARN			Poste ARN du LaboG
Barettes incolores 0,2 ml avec bouchons individuels	Dutscher	45405	Pièce réserve Et4.c stérilisés par l'aide labo dans des sachets puis stocké en pièce propre. PL14

L'impression de ce document est de votre responsabilité, il n'est plus valable s'il fait l'objet d'une révision

Optical Adhesive Covers (Taqman)	fisher scientific	10299204	Pièce réserve Et3.b
96 Well Optical Reaction plate	fisher scientific	10411785	Pièce réserve Et3.b

## 5.2 Equipement

N° biomed	Equipement	Marque	Modèle	N° de série	Localisation
GENC00115	Centrifugeuse	LABNET	Spectrafuge 16M	B904371	Pré-PCR mix
GENC00113	Vortex	IKA	MS1	05.007472	Pré-PCR mix
GENT0014	Vortex	IKA	type VF2	602941	Pré-PCR mix
GENT0016	Congélateur -20°C (CG015)	GROSSERON	Congélateur Premium	45-569-84-49 (998893205)	Pré-PCR chimie
GENT0017	Congélateur -20°C (CG016)	GROSSERON	Congélateur Comfort	82-120-79-16 (998866702)	Pré-PCR chimie
GENC00116	Congélateur -20°C (CG006)	GROSSERON	Congélateur Comfort NoFrost	277448741	Pré-PCR chimie
GENC00112	Congélateur -20°C (CG007)	GROSSERON	congélateur Comfort	21-944-74-05 (998753600)	Pré-PCR mix
GENT0013	Congélateur -20°C (CG008)	GROSSERON	Congélateur Premium	77-252-68-21 (091717500)	Pré-PCR mix
GENT00137	Congélateur -20°C GP2723 (CG002)	GROSSERON	48.737.449.6	GENT00137	SALLE FRIGO - Labo G - ARN/Recherche
CRB008	Congélateur -80°C (n°1)	GROSSERON	Forma 923 n°1	21563-3812	Tumorothèque
GENT0019	Cabine à UV	ERLAB	Captair Biocap DNA	DNA 1240909	Pré-PCR chimie ( <i>reconditionnement des amorces et sondes / aliquotage</i> )
GENT00163	QuantStudio 5	APPLIED BIOSYSTEMS	QS5	272521922	Salle PCR

## 5.3 Réactifs

Réactifs	Fournisseur	Référence	Mode d'emploi	STOCKAGE	
				STOCK	REACTIFS EN COURS
TAQPATH 1-STEP RT-QPCR MM (Master mix 4X)	Life technologies	A15299	Prêt à l'emploi	Salle Pré-PCR chimie : CG016-tiroir D	Salle Pré-PCR mix : CG008-tiroir 3
TAQMAN 2019NCOV ASSAY KIT V1 (Amorces)	Life technologies	A47532	Prêt à l'emploi	Salle Pré-PCR chimie : CG015-tiroir A	Salle Pré-PCR mix : CG008-tiroir 1
TAQMAN 2019NCOV CONTROL KIT V1 (contrôle positif)	Life technologies	A47533	Prêt à l'emploi	Labo G : CG002-tiroir E	Labo G : CG002-tiroir E
H2O RNase Free	Life technologies	AM9939	Prêt à l'emploi	Salle Pré-PCR chimie : étagère PL12d	Salle Pré-PCR mix (aliquots) : CG007-tiroir 1

## 6 REALISATION DE LA REVERSE TRANSCRIPTION – PCR EN TEMPS REEL (RT-QPCR 1 STEP) COVID-19

 **Le port de gants est obligatoire tout au long de la manipulation.**

La réaction de RT-qPCR doit être réalisée à partir de :

- 5µL d'ARN viral extrait à partir du Kit QIAamp® Viral RNA Mini
- 5µL du blanc d'extraction (témoin négatif d'extraction)
- 5µL d'H2O (témoin négatif de RT-PCR)
- 1µL de témoin positif (2019-nCoV Control v1)

### 6.1 Préparation de la série

#### 6.1.1 Témoins positifs et négatifs utilisés

##### Témoin positif :

Utiliser 1µL de contrôle positif 2019-nCoV v1 pour chaque réaction de RT-qPCR (3 réactions de RT-qPCR/plaque : ORF1ab/ RNaseP, S Protein/ RNaseP, N Protein/RNaseP)

Le contrôle positif 2019-nCoV Control Kit v1 (Cat. No. A47533) est un contrôle positif synthétique qui contient des séquences cibles pour chacun des couples amorces/sondes inclus dans kit « 2019-nCoV Assay Kit v1 » (Cat. No. A47532).

### **Témoin blanc extraction :**

Dans chaque expérience de RT-qPCR, tester un témoin négatif ayant suivi la totalité du processus d'extraction avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini.

### **Témoin négatif H<sub>2</sub>O:**

Dans chaque expérience, un témoin négatif est réalisé. Il s'agit d'un témoin eau qui suit la totalité du processus pour les 3 réactions de RT-qPCR.

### **Contrôle positif interne :**

Pour chaque réaction, chaque essai 2019-nCoV est réalisé en duplex avec la recherche du transcrit RNase P.

### **Préliminaires :**

- Préparer la feuille de travail (PAM-FQ-0272: Feuille de travail RT-qPCR COVID-19)
- Sortir les ARN du congélateur (patients + témoin positif) et les décongeler dans un bac de glace en salle de dépôt d'ADN/ARN.

## **6.2 Réalisation du mélange réactionnel (pièce pré-PCR)**

### **6.2.1 Tableau récapitulatif des noms et des concentrations des tests (couples amorces+/- et sonde)**

Mix amorces/sondes	Concentration initiale	T° stockage
2019-nCoV (ORF1ab) (Tube 1) *FAM	20X	-20°C
2019-nCoV (S Protein) (Tube 2) *FAM	20X	-20°C
2019-nCoV (N Protein) (Tube 3) *FAM	20X	-20°C
RNase P Assay (Tube 4) *VIC	20X	-20°C

### **6.2.2 Préparation des mix RT-PCR (pièce propre)**

 **PROTEGER LES MIX AMORCES/SONDES ET LE MASTER-MIX DE LA LUMIERE.**

1. Décongeler les réactifs :
  - Master Mix 4X
  - 2019-nCov assay -> Tube 1, 2, 3
  - RNase P Assay
 } Décongeler à l'abri de la lumière
- Eau RNase free
2. Les vortexer et centrifuger brièvement une fois décongelés.

3. Déterminer le nombre de réactions requises :

En plus des échantillons, inclure pour chaque plaque TaqMan :

- une réaction 2019-nCoV Control v1 (témoin positif) par test 2019-nCoV
- un contrôle sans matrice (NTC = témoin négatif H<sub>2</sub>O) par test 2019-nCoV
- passer les blancs d'extractions de chaque série d'extraction d'ARN viral
- un ou deux mélange(s) réactionnel(s) en excès pour l'erreur de pipetage

- Si le nombre d'échantillons (n) incluant les contrôles est compris entre 1 et 14, alors N = n + 1
- Si le nombre d'échantillons (n) incluant les contrôles est supérieur ou égal à 15, alors N = n + 2

4. Préparer les 3 mix de RT-qPCR suivants dans des tubes RNase-free de 1,5 ou 2mL (adapter les volumes en fonction du nombre de tubes requis) :

- mix 1 = 2019-nCoV (ORF1ab) (Tube 1) \*FAM + RNase P Assay (Tube 4) \*VIC
- mix 2 = 2019-nCoV (S Protein) (Tube 2) \*FAM + RNase P Assay (Tube 4) \*VIC
- mix 3 = 2019-nCoV (N Protein) (Tube 3) \*FAM + RNase P Assay (Tube 4) \*VIC

	pour 1 tube
TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4X)	6,25
2019-nCoV assay (20X) (tube 1, 2 ou 3)	1,25
RNase P Assay (20X)	1,25
H2O	11,25
<b>TOTAL</b>	<b>20,00</b>

5. Vortexer puis centrifuger brièvement les 3 mix, puis les stocker sur glace.

6. Placer une plaque MicroAmp™ (0,2 ml) sur bloc froid

7. Distribuer 20µL de chaque mix dans la plaque selon la répartition suivante :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	<b>MIX1</b>				<b>MIX2</b>				<b>MIX3</b>			

La configuration des plaques peut varier en fonction du nombre d'échantillons (maximum 30 patients/blancs d'extraction + 2 témoins +/-)

### 6.3 Dépôt des ARN et témoins dans le milieu réactionnel (laboratoire général / salle dépôt ADN)

 Décongeler les ARN viraux et le témoin positif sur glace et les maintenir sur glace lors de leur manipulation.

- Mélanger doucement les ARN viraux ainsi que le témoin 2019-nCoV Control v1 par tapotement puis centrifuger brièvement. Après la centrifugation, placer les tubes d'ARN sur glace.
- Distribuer dans des barrettes de 8 puits placées sur bloc froid :**
  - 16µL d'ARN viral/patients et blanc d'extraction
  - 3,2µL de témoin **2019-nCoV Control v1** + 12.8µL d'eau RNase-free pour le contrôle positif
  - 16µL d'eau RNase-free pour le contrôle NTC

**Exemple :**

**Barrette 1**

3,2µL de <b>Control+</b> + 12,8µL H2O	NTC : 16µL H2O	16µL ARNv <b>Patient 1</b>	16µL ARNv <b>Patient 2</b>	16µL ARNv <b>Patient 3</b>	16µL ARNv <b>Patient 4</b>	16µL ARNv <b>Patient 5</b>	16µL ARNv <b>Patient 6</b>
--	-------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

**Barrette 2**

16µL ARNv <b>Patient 7</b>	16µL ARNv <b>Patient 8</b>	16µL ARNv <b>Patient 9</b>	16µL ARNv <b>Patient 10</b>	16µL ARNv <b>Patient 11</b>	16µL ARNv <b>Blanc</b> extraction <b>Série1</b>	16µL ARNv <b>Patient 12</b>	16µL ARNv <b>Patient 13</b>
-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--	--------------------------------	--------------------------------

**Barrette 3**

16µL ARNv <b>Patient 14</b>	16µL ARNv <b>Patient 15</b>	16µL ARNv <b>Patient 16</b>	16µL ARNv <b>Patient 17</b>	16µL ARNv <b>Patient 18</b>	16µL ARNv <b>Patient 19</b>	16µL ARNv <b>Patient 20</b>	16µL ARNv <b>Patient 21</b>
--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

**Barrette 4**

16µL ARNv <b>Patient 22</b>	16µL ARNv <b>Blanc</b> extraction <b>Série2</b>						
--------------------------------	--	--	--	--	--	--	--

*La configuration des barrettes peut varier en fonction du nombre d'échantillons à tester sur la plaque.*

- A l'aide d'une pipette multicanaux, distribuer 5µL de chaque échantillon préparé précédemment en barrette dans chacun des 3 mix répartis dans la plaque (changer de cônes avant chaque dépôt) :

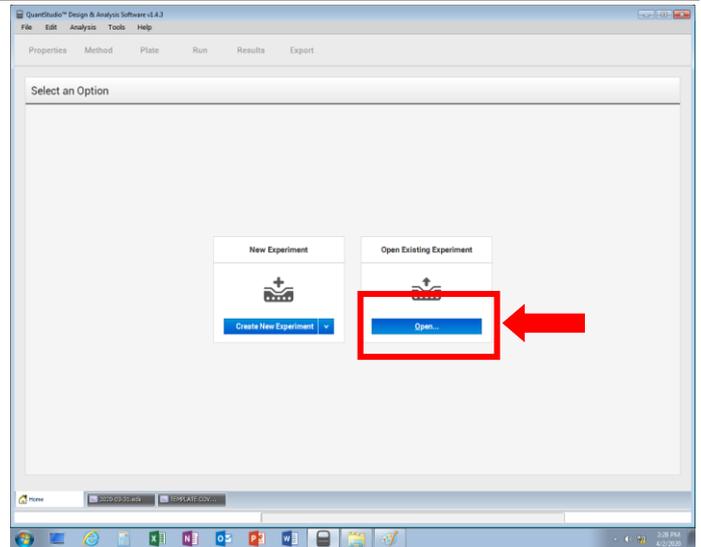
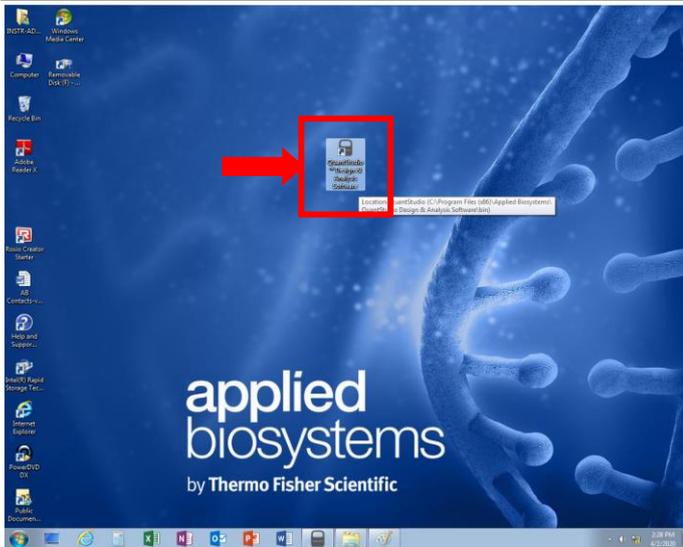
12	5µL Patient 22	5µL Blanc extraction Série 2							MIX3
11	5µL Patient 14	5µL Patient 15	5µL Patient 16	5µL Patient 17	5µL Patient 18	5µL Patient 19	5µL Patient 20	5µL Patient 21	
10	5µL Patient 7	5µL Patient 8	5µL Patient 9	5µL Patient 10	5µL Patient 11	5µL Blanc extraction Série1	5µL Patient 12	5µL Patient 13	
9	5µL dilution T+	NTC : 5µL H2O	5µL Patient 1	5µL Patient 2	5µL Patient 3	5µL Patient 4	5µL Patient 5	5µL Patient 6	
8	5µL Patient 22	5µL Blanc extraction Série 2							MIX2
7	5µL Patient 14	5µL Patient 15	5µL Patient 16	5µL Patient 17	5µL Patient 18	5µL Patient 19	5µL Patient 20	5µL Patient 21	
6	5µL Patient 7	5µL Patient 8	5µL Patient 9	5µL Patient 10	5µL Patient 11	5µL Blanc extraction Série1	5µL Patient 12	5µL Patient 13	
5	5µL dilution T+	NTC : 5µL H2O	5µL Patient 1	5µL Patient 2	5µL Patient 3	5µL Patient 4	5µL Patient 5	5µL Patient 6	
4	5µL Patient 22	5µL Blanc extraction Série 2							MIX1
3	5µL Patient 14	5µL Patient 15	5µL Patient 16	5µL Patient 17	5µL Patient 18	5µL Patient 19	5µL Patient 20	5µL Patient 21	
2	5µL Patient 7	5µL Patient 8	5µL Patient 9	5µL Patient 10	5µL Patient 11	5µL Blanc extraction Série1	5µL Patient 12	5µL Patient 13	
1	5µL dilution T+	NTC : 5µL H2O	5µL Patient 1	5µL Patient 2	5µL Patient 3	5µL Patient 4	5µL Patient 5	5µL Patient 6	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	

4. Sceller la plaque avec un film adhésif optique.
5. Centrifuger brièvement la plaque (laboratoire général).
6. Recongeler les ARN à -20°C en veillant à bien respecter leur position, ou renseigner s'ils ont été épuisés lors de la réaction dans le SIL Ariane.

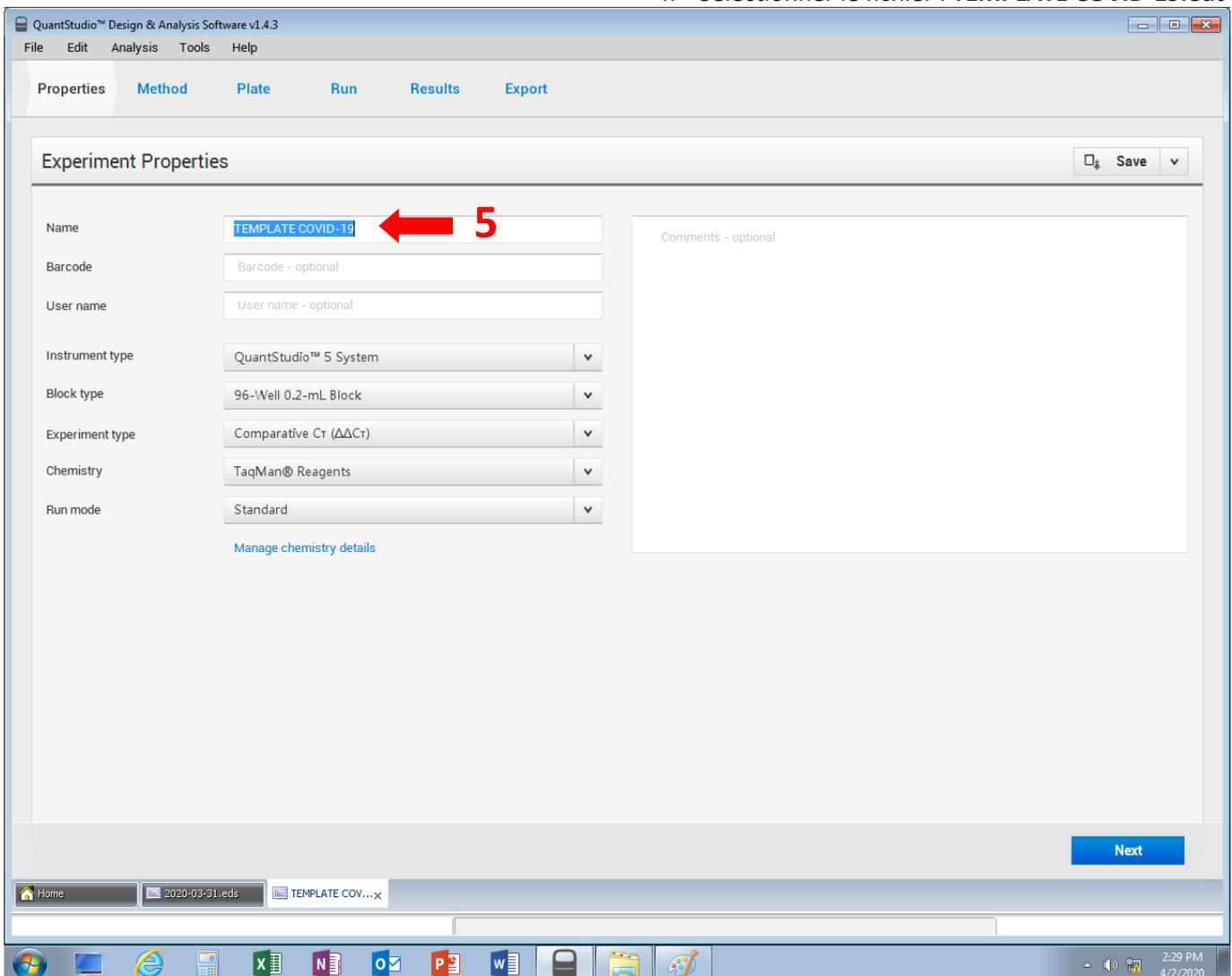
#### 6.4 Lancement de la plaque sur le QuantStudio 5

Se référer au document : **PAM-MOP-0089 Utilisation du QuantStudio 5.**

1. Charger la plaque dans le QuantStudio5.

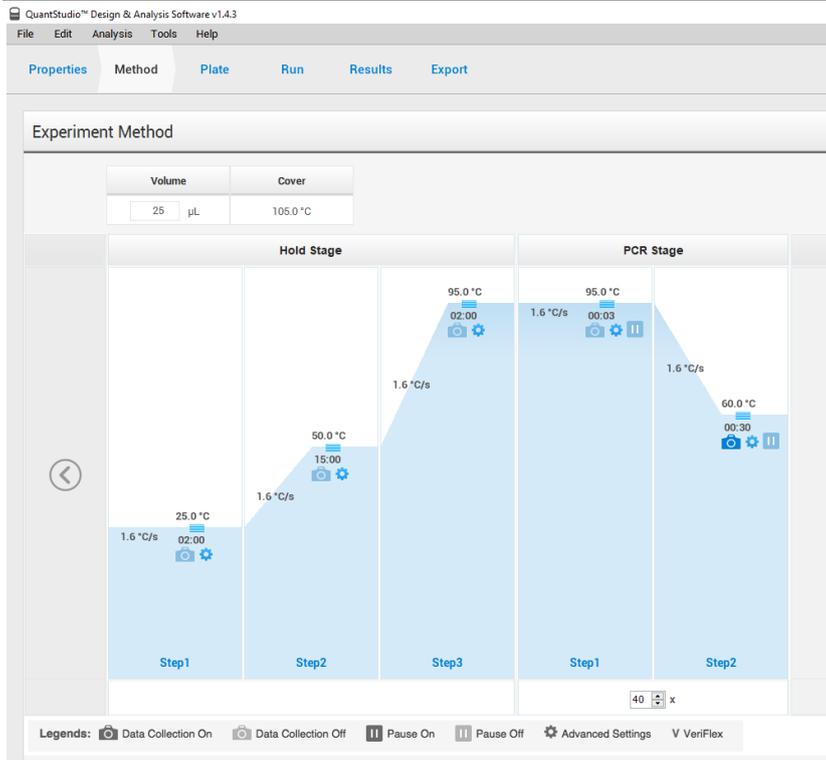


2. Ouvrir le logiciel « QuantStudio™ Design & Analysis Software »
3. Cliquer sur « Open » dans l'icône « Open Existing Experiment » : **Computer** → **AB SW&DATA(D:)** → **dossier COVID-19**
4. Sélectionner le fichier : **TEMPLATE COVID-19.edt**



**Propriété de l'expérience :**

5. Name : Renommer le fichier avec la date et le numéro de série ; ex : **20200101\_ST-20-COVID19.RT-PCR-000X**
6. Vérifier le paramétrage de l'expérience (cf paramètres image ci-dessus)
7. Cliquer sur Next



**Programme PCR Taqman**

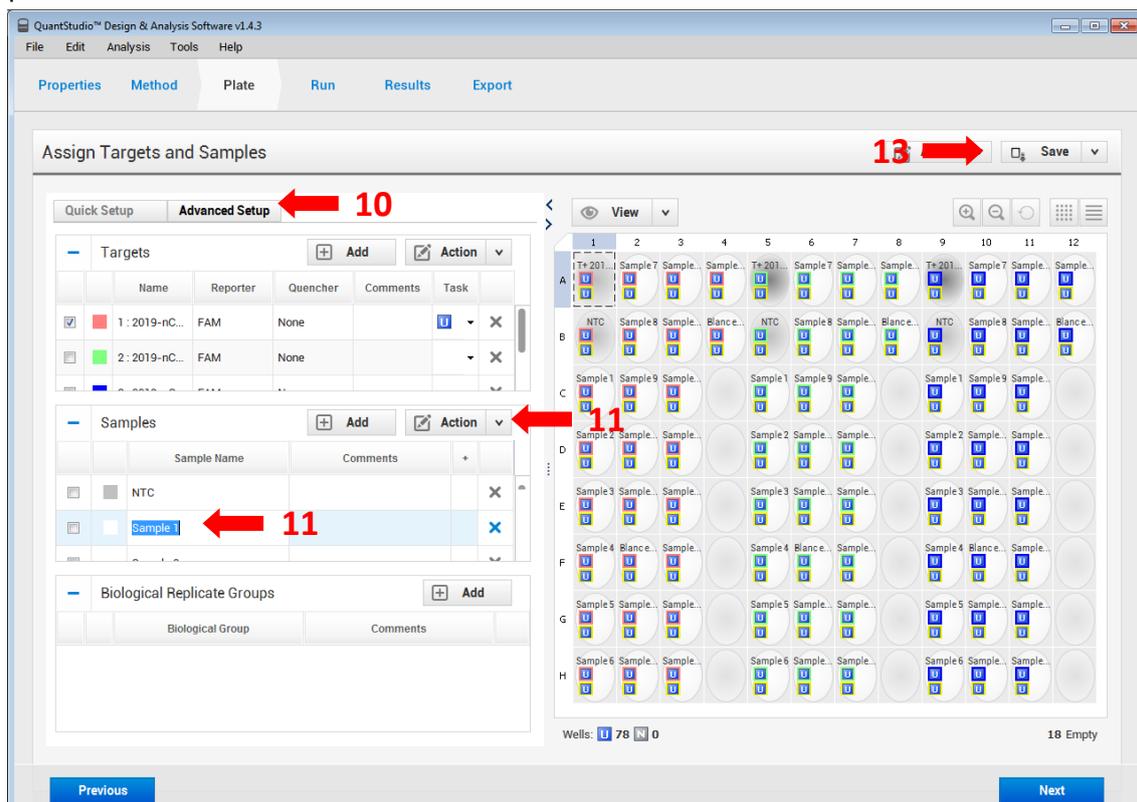
25°C 2min.  
50°C 15min.  
95°C 2min.

95°C 3sec  
60°C 30sec

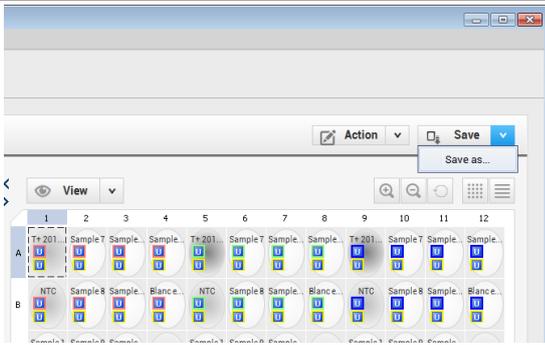
**40 cycles**

**➔ Volume réactionnel : 25µL**

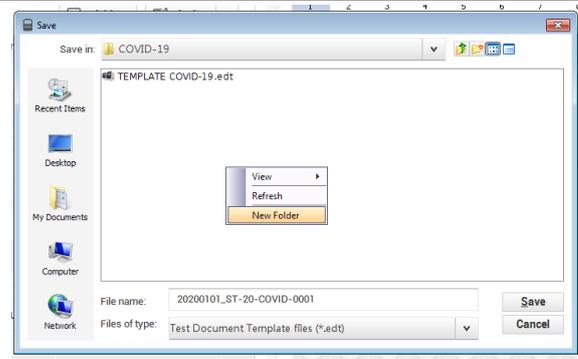
8. Vérifier le paramétrage de la méthode (cf paramètres image ci-dessus).
9. Cliquer sur Next



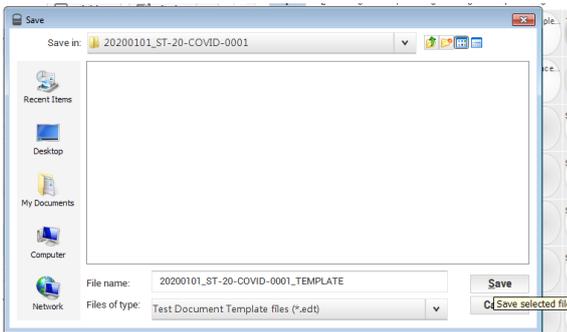
10. Cliquer sur l'onglet « Advanced Setup ».
11. Cliquer sur chaque patient « Sample N°XX » puis renommer avec l'identité patient (nom de naissance\_Numéro SIL). Pour ajouter de nouveaux patients, cliquer sur « Add ».
12. Compléter le plan de plaque situé à droite de l'écran en cliquant-glissant sur les cases désirées puis en cochant les sondes et nom de patient renseigné précédemment.
13. Cliquer sur Next.



14. Cliquer sur Save pour enregistrer le fichier template edt. dans le fichier destination désiré puis cliquer sur Save.

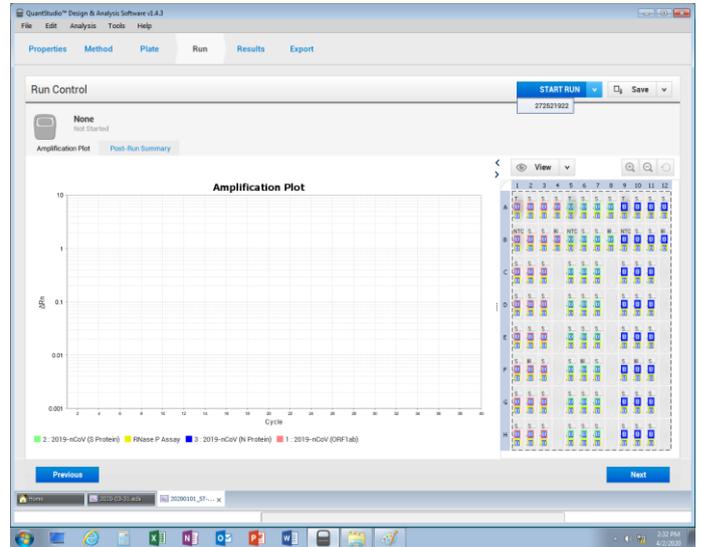


15. Dans le dossier COVID-19 créer un nouveau dossier. Le nommer avec la date et numéro de la série : **20200101\_ST-20-COVID19.RT-PCR-000X**

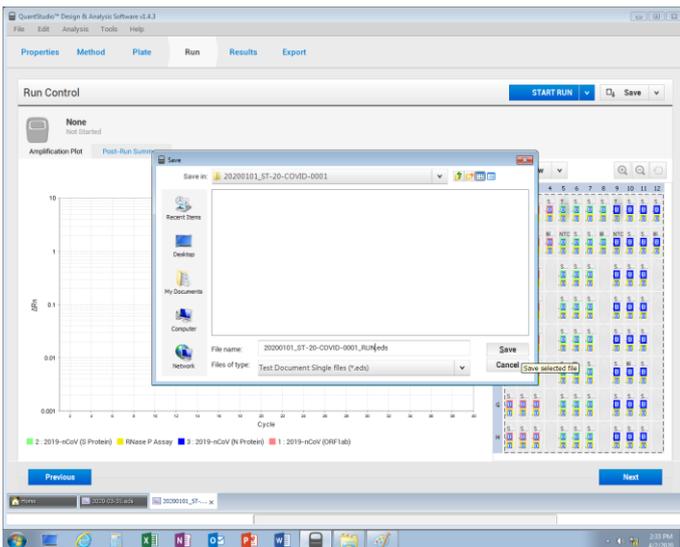


16. Nommer le fichier template .edt de la même façon que le dossier en ajouter \_TEMPLATE à la fin.

17. Cliquer sur NEXT

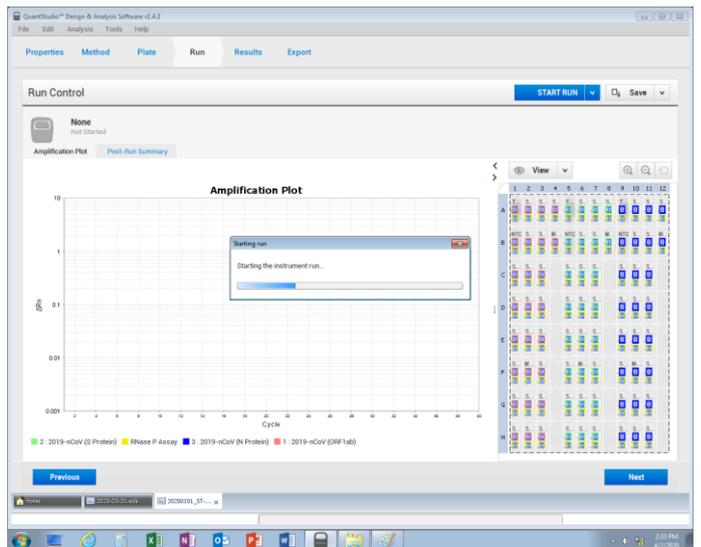


18. Cliquer sur START RUN. Sélectionner le numéro de série du TaqMan.



19. Nommer le fichier .eds de la même façon que le fichier .edt en ajouter \_RUN à la fin.

20. Cliquer sur SAVE

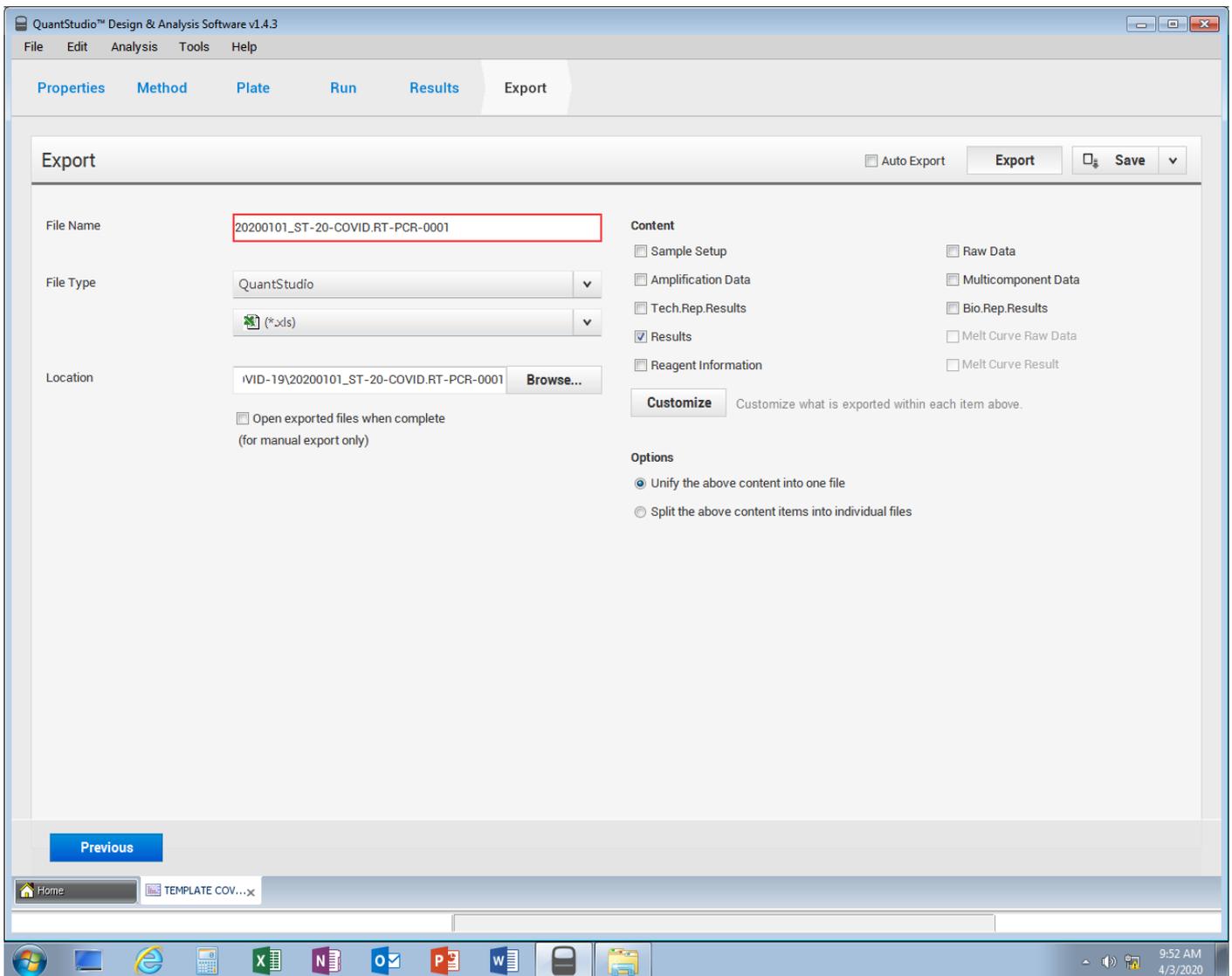


Le run se lance.

Durée du RUN : 70 minutes

## 7 ANALYSE TECHNIQUE DES RESULTATS

### 7.1 Export des résultats à partir du QuantStudio (PAM-MOP-0090)



- Copier le dossier de la série contenant Template, Résultats et Run sur une clé USB
- Copier ce dossier dans : P:\Genetique\1-covid19\RESULTATS\2020\mois\date-série
- Dans le fichier excel Résultats, supprimer les colonnes inutiles (conserver : Wel position, Sample Name, Target Name, CT)

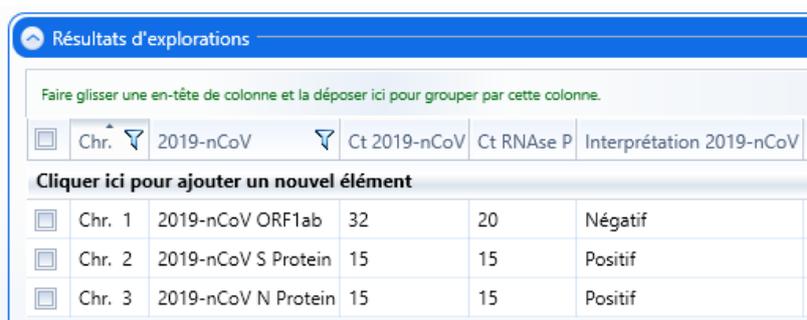
### 7.2 Analyse des résultats

- 1- Reporter les valeurs de Ct obtenues pour chaque sonde sur la feuille de travail PAM-FQ-0272
- 2- **Vérifier la conformité des témoins :**
  - Témoin positif 2019-nCoV : Ct  $\leq$  30
  - Témoins négatifs : Ct *undetermined* (aucune valeur)
- 3- Remplir le fichier excel de suivi des cas COVID-19 avec les valeurs obtenues

➤ Critères d'interprétation d'un puit :

2019-nCoV FAM	Ct < 37	<b>Positif</b>
RNAse P VIC	Any value	
2019-nCoV FAM	37 ≤ Ct < 40	<b>Douteux</b>
RNAse P VIC	Any value	
2019-nCoV FAM	Undetermined ou = 40	<b>Négatif</b>
RNAse P VIC	Ct < 40	
2019-nCoV FAM	Undetermined ou = 40	<b>Invalide</b>
RNAse P VIC	Undetermined ou = 40	

4- Saisir les résultats dans le SIL. Ex :



## 8 INTERPRETATION MEDICALE DES RESULTATS

NB : avant de commencer, s'assurer que la boîte de messagerie Outlook est ouverte afin de transmettre la SA directement par mail via l'impression par Multix PDF Shaker.

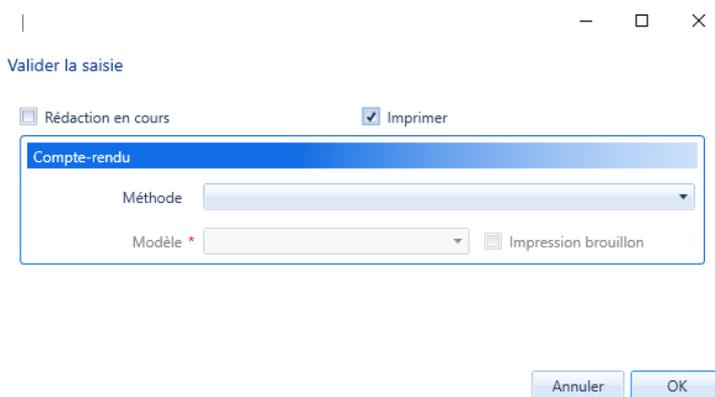
Suite à la saisie des résultats par le technicien, la synthèse analytique (SA) est automatiquement générée (modèle COVID-19, bible COVID-19) et les résultats sont automatiquement cochés comme validés.

➤ Critères d'interprétation globale :

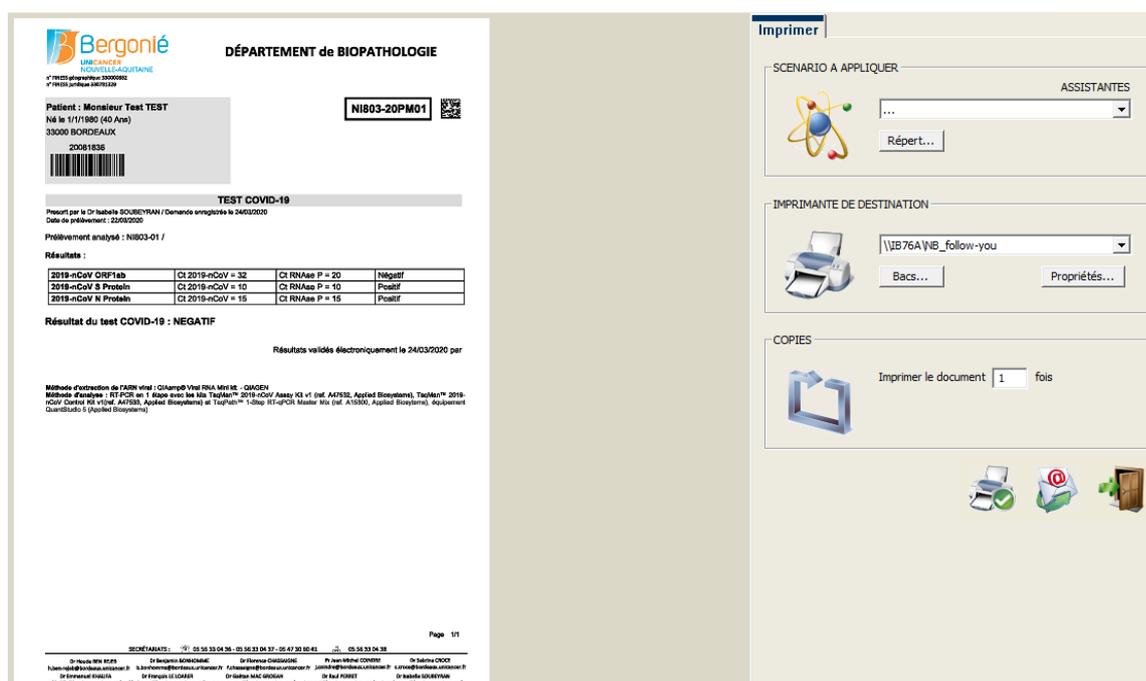
2 mix positifs sur 3	<b>Positif</b>
1 mix positif sur 3 sur 1 prélèvement	<b>Douteux – A contrôler</b>
1 mix positif sur 3 dans 2 prélèvements d'un même patient	<b>Positif</b>
3 mix négatifs	<b>Négatif</b>
Résultats invalides	<b>Non contributif – A contrôler</b>

- 1- Sélectionner la SA et cliquer sur « Modifier »
- 2- Modifier si besoin les résultats directement dans la grille d'exploration
- 3- Cliquer dans la zone éditeur « BM / Résultat » :
  - les valeurs modifiées dans la grille d'exploration sont automatiquement mises à jour dans le texte
  - remplir le champ de résultat « COVID-19 » (liste avec 4 valeurs possibles : négatif, positif, douteux – à contrôler, non contributif – à contrôler)
  - remplir le champ « Date validation » (taper \* + entrée pour rentrer automatiquement la date du jour)
  - remplir le champ « Responsable de validation biologique »

4- Enregistrer-fermer puis cocher « Imprimer » sur la pop-up de validation :



5- Cliquer sur OK : PDF Shaker s’ouvre avec une prévisualisation de la SA



6- Cliquer sur  : la messagerie s’ouvre sur un nouveau mail, la SA est automatiquement insérée comme pièce jointe

7- Ajouter les destinataires : [sec.biologie@bordeaux.unicancer.fr](mailto:sec.biologie@bordeaux.unicancer.fr), [F.Durrieu@bordeaux.unicancer.fr](mailto:F.Durrieu@bordeaux.unicancer.fr), [j.blanchi@bordeaux.unicancer.fr](mailto:j.blanchi@bordeaux.unicancer.fr)

8- Envoyer le mail

9- Terminer la demande Ariane depuis le lister demandes (bouton « Terminer »)

➤ **Circuit du compte-rendu selon BPAT-PROC-0039 :**

Le pdf de résultats Ariane est intégré dans le logiciel de biologie Hexalis. Les biologistes de l’unité de Biologie génèrent ensuite un compte-rendu qui est transmis dans HM.

NB : la facturation est gérée par Hexalis, aucune cotation n’est saisie dans Ariane.