


|   |  |   |
|---|--|---|
| <br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec                         | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b> |   |
|   | Secteur : IDBM                                   |   |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b> |  | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |

|              |  |
|--------------|--|
| Rédigé par : | Marc-Christian Domingo                         |
| Révisé par : | Cynthia Massé, Michel Roger, Philippe Dufresne |
|              |  |

## 1. OBJET

Ce document décrit 2 méthodes d'amplification d'acides nucléiques, TAAN multiplex, pour détecter les virus SRAS-CoV-2/Influenza A/ Influenza B/ RSV/ Contrôle interne avec le thermocycleur LC480 II.

- 1) Protocole de Roche avec les trousse LightMix sur le LC480 II
- 2) Protocole maison LSPQ sur le LC480 II

## 2. PRINCIPE

Les protocoles d'amplification par RT-PCR décrits ciblent des séquences nucléotidiques appartenant aux virus SRAS-CoV-2, Influenza A, Influenza B et RSV ainsi que celles d'un contrôle interne, soit le CI de la trousse LightMix (EAV, Equine Arteritis Virus), soit le CI du protocole LSPQ (phage MS2). Les extraits d'acides nucléiques sont préparés à l'aide d'une plateforme d'extraction permettant une purification des acides nucléiques. La plateforme d'amplification validée est le LightCycler LC 480 II.


## 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 ces 2 protocoles.

## 4. MATÉRIEL REQUIS

- Plateforme d'extraction automatisée (ou semi-automatisée) d'acides nucléiques de votre choix
- Thermocycleur LightCycler LC 480 II

|                                     |   |             |
|-------------------------------------|---|-------------|
| Rédigé par : Marc-Christian Domingo | Révisé par : Cynthia Massé, Michel Roger, Philippe Dufresne | Page 1 de 8 |
|-------------------------------------|---|-------------|

|  |   |  |
|--|---|--|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b>  |  |
|  | Secteur : IDBM                                    |  |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>                                    | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |  |

## 5. PROTOCOLE AVEC LES TROUSSES LIGHTMIX DE ROCHE SUR LC 480 II


### 1) Cibles et sondes

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

| Cibles                           | Canal de détection sur LC 480 II |
|----------------------------------|----------------------------------|
| E_Sarbeco<br>Sonde E_Sarbeco     | Canal (440-488); CYAN500S        |
| Influenza A<br>Sonde Influenza A | Canal (465-510); FAM             |
| Influenza B<br>Sonde Influenza B | Canal (533-580); R6G             |
| RSV<br>Sonde RSV                 | Canal (533-610); LC610           |
| CI EAV<br>Sonde EAV              | Canal (618-660)                  |

### 2) Trousse et numéro de catalogue des réactifs du LightMix chez Roche

| Catalogue # | TIB LightMix amorces et sondes               | Format | Contenu   |
|-------------|--|--------|---|
| 09343725001 | Modular SARS-CoV(COVID 19) E-gene            | 96     | Amorces, sondes et contrôles positifs lyophilisés à T°C pièce |
| 07041594001 | Modular Influenza A MD TIB                   |        |   |
| 07041616001 | Modular Influenza B MD TIB                   |        |   |
| 07766343001 | Respiratory Syncytial Virus (RSV) MD TIB     |        |   |
| Catalogue # | Contrôle d'extraction TIB                    | Format |   |
| 07374330001 | LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control | 96     | Amorces, sondes et contrôles positifs lyophilisés à T°C pièce |
| Catalogue # | Mastermix                                    | Format |   |
| 07083173001 | LightCycler® Multiplex RNA Virus Master      | 1000   | qPCR mix<br>RT solution<br>Eau                                |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b>  |  |
|  | Secteur : IDBM                                    |  |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>                                    | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |  |

### 3) Compensation de couleur

Faire une réaction de compensation de couleur (CC) sur le thermocycleur LC 480 II et sauvegarder le fichier sur le logiciel. Ce fichier de CC pourra être utilisé ultérieurement pour interpréter les résultats obtenus aussi bien avec la trousse LightMix de Roche qu'avec le protocole maison du LSPQ.


La compensation de couleur est effectuée à l'aide de la trousse CC\_Hexaplex Plus, no. de cat. 06296971001. La compensation de couleur sur le thermocycleur LC 480 II au LSPQ a été réalisée pour les fluorophores 500S, 530N, 580N, 610N et 660N. Il n'est pas nécessaire d'effectuer la compensation de couleur pour le fluorophore 700N. Le fichier de CC a été sauvegardé sous HEXAPLEX-20200708. Se référer aux instructions données par la compagnie dans l'insert pour effectuer la compensation de couleur.

### 4) Mélange réactionnel pour RT-PCR

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

À titre indicatif

| Reconstitution des amorces et sondes      |   |   |
|---|---|---|
| Réactifs lyophilisés                      | Volume  | Concentration   |
| LighMix InfA M2                           | 50 µl d'eau de la trousse de réactifs pour chacun des tubes de LightMix | Non divulguée par la compagnie. Chaque tube permet 96 réactions au total. |
| LighMix InfB                              |   |   |
| LighMix RSV-A/B                           |   |   |
| LighMix Sarbecovirus SARS-CoV-2           |   |   |
| LighMix contrôle interne EAV <sup>1</sup> |   |   |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b>  |  |
|  | Secteur : IDBM                                    |  |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>                                    | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |  |


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

| <b>Préparation du Mastermix et de la réaction RT-PCR</b>  |                            |
|---|----------------------------|
| <b>Réactifs par réaction</b>  | <b>Volume par réaction</b> |
| Eau PCR grade   | 8,4 µl                     |
| LightMix InfA M2  | 0,5 µl                     |
| LightMix InfB   | 0,5 µl                     |
| LightMix RSV-A/B  | 0,5 µl                     |
| LightMix Sarbecovirus SARS-CoV-2  | 0,5 µl                     |
| LightMix contrôle interne EAV <sup>1</sup>  | 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  | 15 µl                      |
| Extrait purifié d'acides nucléiques (spécimens)<br>OU contrôle positif de chaque cible<br>OU contrôle négatif (eau) | 5 µl                       |
|   |                            |
| Volume total  | 20 µl                      |

<sup>1</sup>L'introduction du contrôle interne à l'étape d'extraction des acides nucléiques est possible, mais n'a pas été validée au moment de la rédaction de ce protocole

## 5) Programme RT-PCR sur le LC 480 II

| <b>Mode</b>            | <b>Température</b> | <b>Durée</b> | <b>Cycle</b> | <b>Ramp rate</b> |
|------------------------|--------------------|--------------|--------------|------------------|
| <b>RT</b>              | 55°C               | 5 min.       | 1            | 4,4              |
| <b>Dénaturation</b>    | 95°C               | 5 min.       | 1            | 4,4              |
| <b>PCR</b>             | 95°C               | 5 sec.       | 45 cycles    | 4,4              |
|                        | 60°C               | 15 sec.      |              | 2,2              |
|                        | 72°C               | 15 sec.      |              | 4,4              |
| <b>Refroidissement</b> | 40°C               | 30 sec.      | 1            | 2,2              |


|  |  |   |
|--|--|---|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b> |   |
|  | Secteur : IDBM                                   |   |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>                                    |  | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |

## 6) Interprétation des résultats selon les données de validation du LSPQ

| Spécimens                               | Résultats <sup>1</sup>                  | Critères du LSPQ <sup>2</sup>                        | Critères de Roche                                    |
|---|---|--|--|
| Contrôle négatif                        | Négatif                                 | Cp ≥ 37 aucune courbe                                |  |
| Contrôles positifs                      | COVID-19<br>FluA<br>FluB<br>RSV         | Cp = 33,48<br>Cp = 33,80<br>Cp = 32,61<br>Cp = 28,83 | Cp = 28-30<br>Cp = 29-31<br>Cp = 29-31<br>Cp = 29-31 |
| Canal (440-488)<br>COVID-19             | Positif                                 | Cp ≤ 35,95<br>RFU ≥ 62,19                            |  |
|   | Négatif / indéterminé<br>ou à reprendre | Cp > 35,95   |  |
| Canal (465-510)<br>Influenza A          | Positif                                 | Cp ≤ 35,10<br>RFU ≥ 12,55                            |  |
|   | Négatif / indéterminé<br>ou à reprendre | Cp > 35,10   |  |
| Canal (533-580)<br>Influenza B          | Positif                                 | Cp ≤ 35,38<br>RFU ≥ 6,4                              |  |
|   | Négatif / indéterminé<br>ou à reprendre | Cp > 35,38   |  |
| Canal (533-610)<br>RSV                  | Positif                                 | Cp ≤ 35,68<br>RFU ≥ 7,72                             |  |
|   | Négatif / indéterminé<br>ou à reprendre | Cp > 35,68   |  |
| Canal (618-660)<br>Contrôle interne EAV | Positif                                 | ± 29,8   | 27-30  |

<sup>1</sup>Toujours apprécier l'allure sigmoïdale de la courbe avant de valider les résultats


<sup>2</sup>Critères établis après validation de 233 spécimens cliniques sur l'instrument LC 480 II du LSPQ

|   |   |  |
|---|---|--|
| <br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec                         | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b>  |  |
|   | Secteur : IDBM                                    |  |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b> | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |  |

## 6. PROTOCOLE MAISON DU LSPQ SUR LC 480 II

### 1) Cibles, amorces et sondes

| Cibles       | Séquence   | Canal   | Source         |
|--------------|--|---------|----------------|
| CDCfluAf3    | TAAAGACCAAGACCAATCYTGTCACCTCTGACTAA                  |         | TIB<br>MOLBIOL |
| InfA-reverse | AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA                             |         |                |
| CDCfluAp     | /Cyan500/TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG/BBQ                | 440-488 |                |
| E_Sarbeco_F1 | ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT                   |         | IDT            |
| E_Sarbeco_R2 | ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A                        |         |                |
| E_Sarbeco_P1 | /FAM/ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG/IABQ1        | 465-510 |                |
| WuhanCoVnf   | AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT G                        |         | IDT            |
| WuhanCoVnr   | CGG TGA ACC AAG ACG CAG TAT TAT                      |         |                |
| CoVnp        | /FAM/CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA C/IABQ1 | 465-510 |                |
| CDCfluBf     | TCCTCAACTCACTCTTCGAGCG                               |         | TIB<br>MOLBIOL |
| CDCfluBr     | CGGTGCTCTTGACCAAATTGG                                |         |                |
| CDCfluBp     | /YAK/CCAATTTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG/BBQ/               | 533-580 |                |
| RSV-F2       | GGCAAATATGGAAACATACGTGAACA                           |         |                |
| RSV-R2       | GGCACCCATATTGTWAGTGATGCAG                            |         |                |
| RSVp         | /LC610/CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT/BBQ/              | 533-610 |                |
| MS2TM2f      | TGCTCGCGGATACCCG                                     |         |                |
| MS2TM2r      | AACTTGCGTTCTCGAGCGAT                                 |         |                |
| MS2TM2p      | /LC670/ACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGT/BBQ/                 | 618-660 |                |

|  |  |   |
|--|--|---|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br><small>Laboratoire de santé publique<br/>du Québec</small> | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b> |   |
|  | Secteur : IDBM                                   |   |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>  |  | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |

## 2) Trousse et numéro de catalogue des réactifs du protocole LSPQ

| Catalogue # | ThermoFisher Mastermix                            | Format | Contenu  |
|-------------|---|--------|----------|
| A28523      | TaqPath® 1-Step multiplex Master Mix<br>NO ROX 4X | 10 mL  | qPCR mix |


## 3) Mélange réactionnel pour RT-PCR

| Réactifs par réaction   | Concentration   | Volume par réaction |
|---|-----------------|---------------------|
| Eau PCR grade   |                 | 0 µl                |
| Amorces et sonde CDCfluA  | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| Amorces et sonde gène E   | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| Amorces et sonde gène N   | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| Amorces et sonde CDCfluB  | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| Amorces et sonde RSV-A/B  | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| Amorces et sondes contrôle interne MS2 <sup>1</sup>   | 0,4 µM / 0,2 µM | 1,67 µl             |
| qPCR TaqPath no Rox reaction mix 4X   | 1X              | 5,0 µl              |
|   |                 |                     |
| Volume de mastermix à distribuer  |                 | 15 µl               |
| Extrait purifié d'acides nucléiques (spécimens)<br>OU contrôle positif de chaque cible<br>OU contrôle négatif (eau) |                 | 5 µl                |
|   |                 |                     |
| Volume total  |                 | 20 µl               |

<sup>1</sup>L'introduction du contrôle interne à l'étape d'extraction des acides nucléiques est possible, mais n'a pas été validée au moment de la rédaction de ce protocole

## 4) Programme RT-PCR sur le LC 480 II

| Mode            | Température | Durée   | Cycle     | Ramp rate |
|-----------------|-------------|---------|-----------|-----------|
| RT              | 53°C        | 10 min. | 1         | 4,4       |
| Dénaturation    | 95°C        | 2 min.  | 1         | 4,4       |
| PCR             | 95°C        | 5 sec.  | 45 cycles | 4,4       |
|                 | 60°C        | 15 sec. |           | 2,2       |
|                 | 72°C        | 15 sec. |           | 4,4       |
| Refroidissement | 40°C        | 30 sec. | 1         | 2,2       |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <br>Institut national<br>de santé publique<br><b>Québec</b><br>Laboratoire de santé publique<br>du Québec | <b>PROCÉDURE OPÉRATIONNELLE NORMALISÉE (PON)</b>  |  |
|  | Secteur : IDBM                                    |  |
| <b>Protocoles multiplex SRAS-CoV-2/Influenza A/Influenza B/RSV :</b><br><b>1) Trousse LightMix de Roche</b><br><b>2) Protocole maison du LSPQ (LDT)</b>                                    | <b>VERSION</b><br><b>1.0</b><br><b>2020-11-05</b> |  |

### 5) Interprétation des résultats selon les données de validation du LSPQ

Les critères ont été déterminés après une analyse effectuée en deuxième dérivée

| Spécimens                               | Résultats <sup>1</sup>               | Critères du LSPQ <sup>2</sup>                                     |
|---|--------------------------------------|---|
| Contrôle négatif                        | Négatif                              | Cp ≥ 37, aucune courbe  |
| Contrôles positifs                      | COVID-19<br>FluA<br>FluB<br>RSV      | Cp variable (valeur de Cp non encore fixée)                       |
| Canal (440-488)<br>Influenza A          | Positif                              | Cp ≤ 32,25<br>RFU ≥ 27,41   |
|   | Négatif / indéterminé ou à reprendre | Cp > 32,25  |
| Canal (465-510)<br>COVID-19             | Positif                              | Cp ≤ 32,91<br>RFU ≥ 9,37  |
|   | Négatif / indéterminé ou à reprendre | Cp > 32,91  |
| Canal (533-580)<br>Influenza B          | Positif                              | Cp ≤ 35,35<br>RFU ≥ 19,59   |
|   | Négatif / indéterminé ou à reprendre | Cp > 35,35  |
| Canal (533-610)<br>RSV                  | Positif                              | Cp ≤ 33,35<br>RFU ≥ 7,3   |
|   | Négatif / indéterminé ou à reprendre | Cp > 33,35  |
| Canal (618-660)<br>Contrôle interne MS2 | Positif                              | 21,83 ± 0,33 (valeur de Cp du contrôle d'extraction MS2 à suivre) |

<sup>1</sup>Toujours apprécier l'allure sigmoïdale de la courbe avant de valider les résultats

<sup>2</sup>Critères établis après validation de 233 spécimens cliniques sur l'instrument LC 480 II du LSPQ.