

RT-qPCR de détection SARS-CoV-2 / Protocole Institut Pasteur Paris v.2

Document rédigé par le CNR VIR de l'Institut Pasteur de Paris (06/04/2021).

Modification du set d'amorces/probe nCoV-IP4

Comme rapporté dans la note du CNR du 18/03/2021¹, Une mutation C14050T dans la région de l'ORF1a ciblée par la sonde IP4 a été observée pour moins de 5% des séquences de SARS-CoV2 et plus fréquemment pour le variant 20I/501Y.V1 (B.1.1.7).

Afin de pallier l'impact de cette mutation sur la détection du SARS-CoV-2 pour la cible IP4 qui se traduit par des résultats discordants entre les cibles IP2 et IP4, le CNR VIR a mis à jour le protocole de détection de référence.

La modification concerne la composition du mix réactionnel qui devra inclure un mélange équimolaire des deux sondes (IP4) suivantes :

nCoV_IP4-14084Probe-1 (+) / design 1	TCATACAAACCACGCCAGG
nCoV_IP4-14084Probe-2 (+) / design 2	TCATACAAACCACGCTAGG

Les tests réalisés selon les conditions du CNR VIR indiquent que la sensibilité de la technique restent inchangée. Veuillez trouver ci-dessous le mix réactionnel utilisé pour les tests. Les autres paramètres du protocole restent inchangés.

Multiplex Mix (nCoV_IP2&IP4)

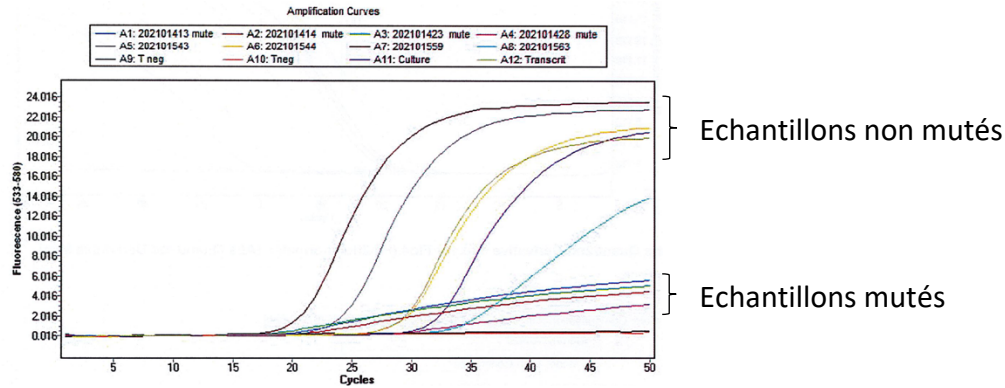
	Vol (µL)	[final]
H2O PPI	1,3	
Reaction mix 2X	12.50	3mM Mg
MgSO4 (50mM)	0.40	0.8mM Mg
nCoV_IP2-12669Fw (10µM)	1.00	0.4µM
nCoV_IP2-12759Rv (10µM)	1.00	0.4µM
nCoV_IP4-14059Fw (10µM)	1.00	0.4µM
nCoV_IP4-14146Rv (10µM)	1.00	0.4µM
nCoV_IP2-12696bProbe(+) (10µM)	0.4	0.16µM
nCoV_IP4-14084Probe-1+2(+)* (10µM)	0.4	0.16µM
SuperscriptIII RT/Platinum Taq Mix	1.00	
Final Volume	20.00	

*Mélange préalable équimolaire (1 :1) des deux sondes nCoV-IP4-14084Probe-1 et nCoV-IP4-14084Probe-1

¹ https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/03/Modif_IP4_probe_210317_CNRVIR210318.pdf

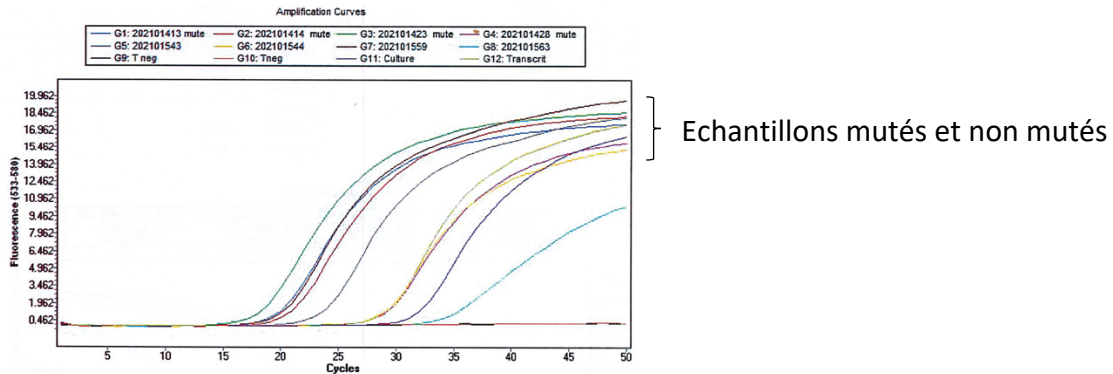
Illustrations – courbes et tableaux des Ct

Résultats avec IP4 design 1



Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	202101413 mute	Unknown	20.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	202101414 mute	Unknown	21.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	202101423 mute	Unknown	18.02			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	202101428 mute	Unknown	29.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	202101543	Unknown	24.08			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	202101544	Unknown	29.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	202101559	Unknown	20.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	202101563	Unknown	33.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	T neg	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	Tneg	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	Culture	Unknown	31.79			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	Transcrit	Unknown	29.04			

Résultats avec IP4 /design1+2



Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	202101413 mute	Unknown	19.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	202101414 mute	Unknown	20.74			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	202101423 mute	Unknown	18.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	202101428 mute	Unknown	28.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	202101543	Unknown	23.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	202101544	Unknown	28.78			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	202101559	Unknown	20.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	202101563	Unknown	34.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	T neg	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G10	Tneg	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G11	Culture	Unknown	31.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	Transcrit	Unknown	29.15			