

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

Document rédigé par le Centre National de Référence Virus des Infections Respiratoires et le Hub Bioinformatique et Biostatistique de l'Institut Pasteur de Paris.
(18/03/2021)

Impact d'une mutation dans la sonde IP4 sur la performance de la RT-qPCR du CNR

Suite aux retours de plusieurs laboratoires utilisant la technique de détection du SARS-CoV-2 du CNR de l'Institut Pasteur, nous avons identifié une mutation dans la sonde IP4 responsable de résultats discordants entre les sets d'amorces IP2 et IP4.

En raison d'une substitution (C en T) dans l'ORF1ab en position 14050 (référence NC_004718), la PCR IP4 présente des courbes anormalement plates même si les valeurs de Ct restent identiques à celles obtenus avec la PCR IP2 dans les conditions utilisées par le CNR.

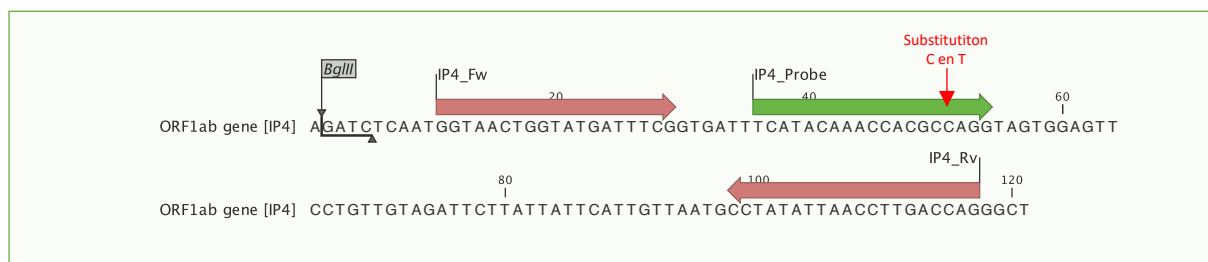


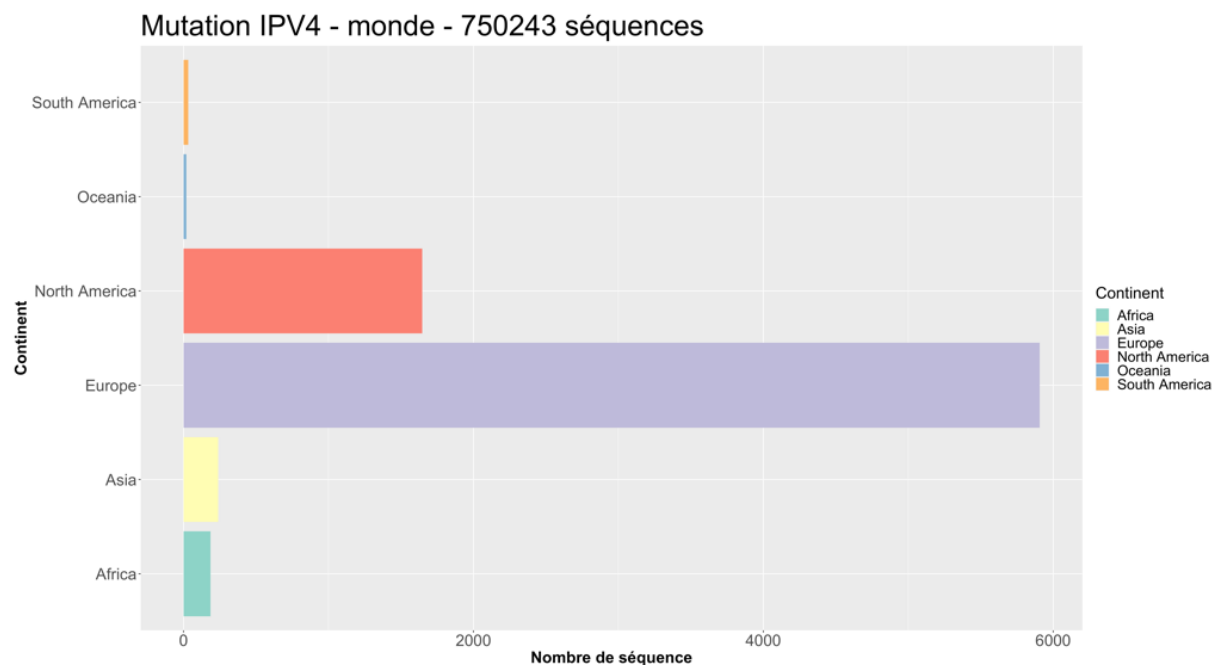
Figure 1 – Set d'amorces IP4 - design initial / mutation dans la sonde IP4

Prévalence de la mutation dans la sonde IP4

Une recherche de la prévalence de cette mutation dans les séquences déposées dans la base de données GISAID a été réalisée.

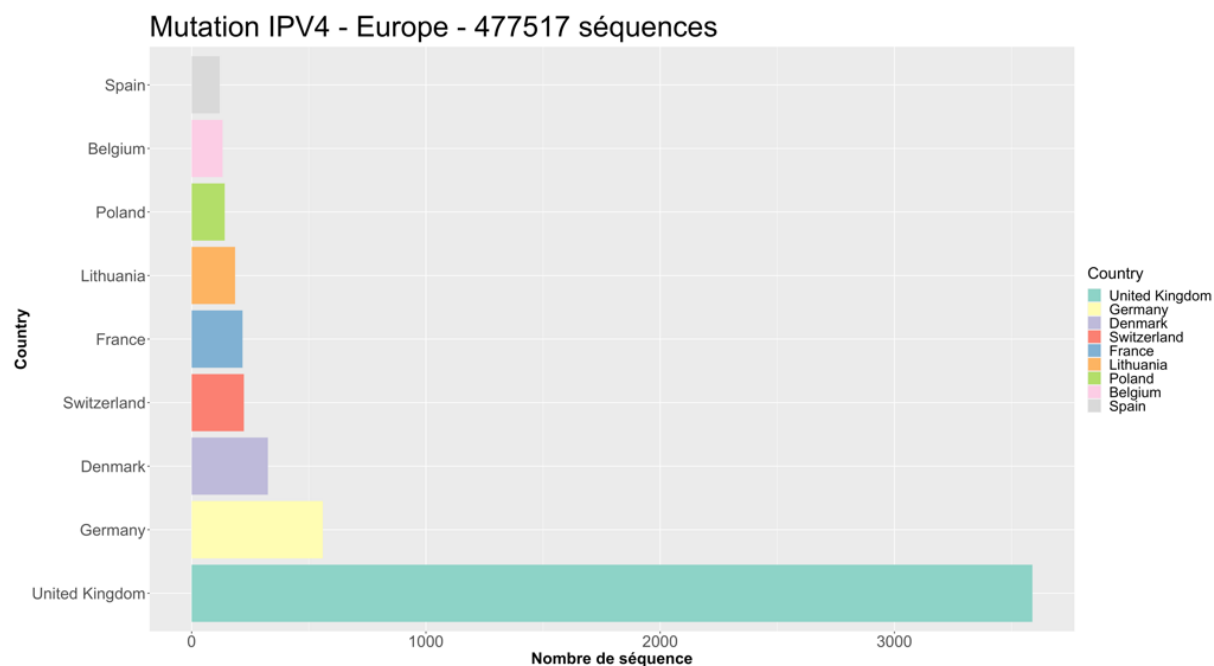
Monde

La mutation nucléotidique C14050T représente seulement 1,07% des séquences disponibles au 12/03/2021 (8028/750243 séquences).



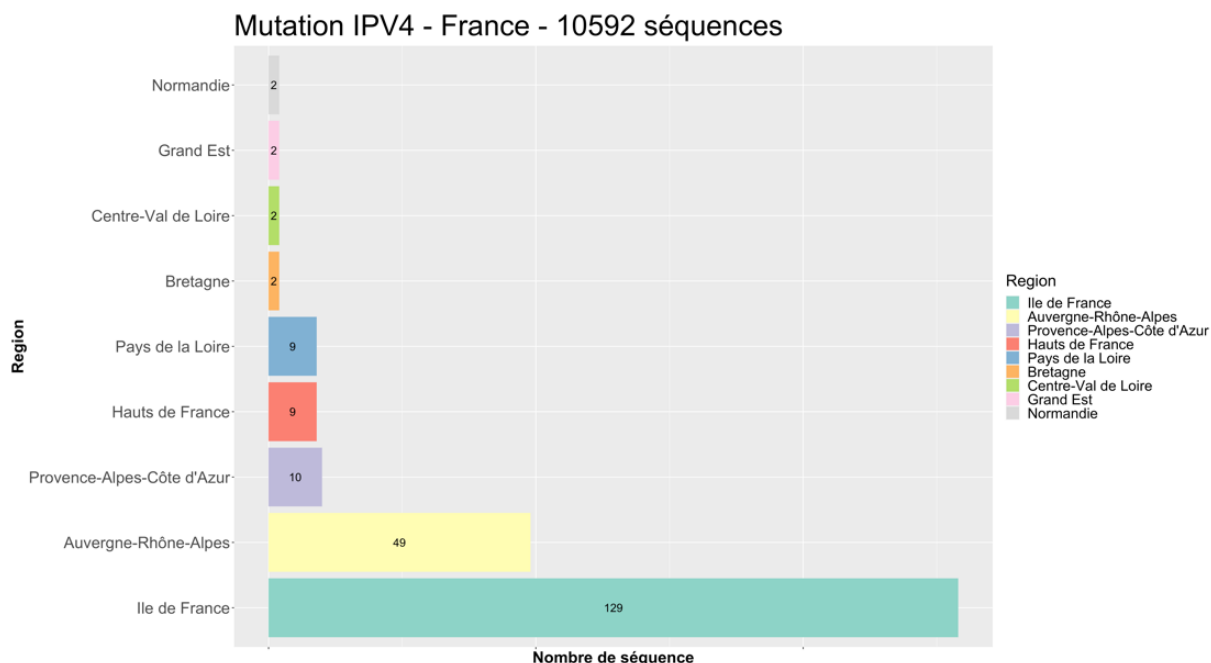
Europe

Cette mutation représente 1,23% des séquences (5906/750243) et est retrouvée très majoritairement au Royaume-Uni (60,8%) où circule principalement le variant anglais.



France

Cette mutation représente 2,04% des séquences (217/10592) et est détectée essentiellement dans des prélèvements issus de laboratoires d'Ile de France.



Quelle que soit la zone géographique, la mutation est retrouvée essentiellement chez des variants 20I/501Y.V1 (UK), 85% au niveau mondial et 92% au niveau national (voir figure ci-dessous)

Monde			Europe			France		
Clade	nb	%	Clade	nb	%	Clade	nb	%
19A	2	0%	19B	2	0%	20A	2	1%
19B	7	0%	20A	103	2%	20A.EU2	2	1%
20A	372	5%	20A.EU2	24	0%	20B	11	5%
20A.EU2	24	0%	20B	173	3%	20I/501Y.V1	200	92%
20B	252	3%	20C	6	0%	20J/501Y.V3	2	1%
20C	109	1%	20D	3	0%	total	217	
20D	5	0%	20E (EU1)	308	5%			
20E (EU1)	308	4%	20G	15	0%			
20F	2	0%	20I/501Y.V1	5269	89%			
20G	91	1%	20J/501Y.V3	3	0%			
20I/501Y.V1	6842	85%	total	5906				
20J/501Y.V3	13	0%						
total	8027							

Figure 2 – Proportion de variants porteurs de la mutation C14050T parmi les clades connus

Actions correctives en cours au CNR

Dans un premier temps la sonde IP4 a été modifiée en conséquence (design à tester 5'-TCATACAAACCACGCTAGG -3').

Des tests comparatifs vont être réalisés pour vérifier la disparition des allures anormales des courbes observées suite à la substitution.

Des analyses de sensibilité et de spécificité seront également menées.

Une fois validées, les modifications de protocole seront diffusées via les canaux de la SFM.