

**Résultats d'évaluation de la performance en analytique**  
**pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19**  
**comparaison avec la technique de référence du CNR IPP**

Evaluation réalisée le 09.04.2020

En complément d'un essai préliminaire du 16.03.2020 (sur ARN congelés)

**Nom du Kit** : RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (REF 821003) TEST RUO

**Fournisseur** : altona DIAGNOSTIC France ®

**Laboratoire Investigateur**

**Pr Bruno Lina**

Laboratoire associé au Centre National de Référence des virus des infections respiratoires

Institut des Agents infectieux

Centre de Biologie et Pathologie Nord

Groupement Hospitalier Nord

103 boulevard de la Croix-Rousse

69317 Lyon CEDEX 04

FRANCE

**Dr Vanessa Escuret** ([vanessa.escuret@chu-lyon.fr](mailto:vanessa.escuret@chu-lyon.fr))

Tel : 04 72 07 10 35

**Correspondants**

**Matthieu Vignoles et Emmanuelle Vincent**



**altona Diagnostics FRANCE**

32 rue Gutenberg

37300 Joué-lès-Tours

FRANCE

## OBJECTIFS

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique et a minima la spécificité du test mentionné ci-dessus, pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison de la technique maison de référence utilisée au CNR de Lyon, à partir :

- de dilutions de culture de virus SARS-CoV-2 à différentes concentrations et
- d'échantillons respiratoires (pour tester l'effet de la matrice type prélèvement respiratoire sur le test) positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2 (mais positifs éventuellement pour d'autres virus respiratoires).

## MATERIELS ET METHODES

### Panel d'échantillons testés

- Surnageant de culture de cellules BGM infectées par SARS-CoV-2
  - échantillon 2020/715 ; récolte après 2 passages (présence d'effet cytopathique)
  - dilutions successives afin de couvrir une large gamme de Ct et d'atteindre une limite de détection (**\* nouvelles dilutions par rapport aux précédentes évaluations**)
- Echantillons respiratoires de patients de différentes nature, positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2 (pour tester a minima l'effet matrice et la spécificité)
  - écouvillons naso-pharyngés (4 positifs, 2 négatifs)
  - aspiration naso-pharyngée (1 positif), aspiration trachéo-bronchique (3 positifs)

### Technique de référence CNR (site de Lyon)

Extraction avec EMAG® bioMérieux selon la technique du fournisseur à partir de 200µL de prélèvement ; éluat de 50µL

Détection de deux cibles en duplex (région RdRp) : amorces et sondes (IP2, IP4)  
([https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2))

SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Ref: Invitrogen 1732-020)

Amplifications sur QuantStudio™ 5 Applied Biosystems™ (à partir de 5µL d'éluat)

Technique évaluée : selon la notice du fournisseur

Principe du test :

- le test est **très simple à utiliser**
- il détecte 2 cibles du SARS-CoV-2 : cible dans le **gène E** (générique bêta-coronavirus groupe B) et cible dans le **gène S** (spécifique SARS-CoV-2) ainsi qu'un **contrôle interne (IC)**.

Mise en œuvre :

- extraction à partir de 200µL de prélèvement respiratoire,
- après 10 minutes de contact avec le tampon de lyse, ajout de 55µL par tube du mélange silice (50µL) + IC (5µL) (à homogénéiser régulièrement), attendre 10 minutes puis,
- extraction sur EMAG,
- RT-PCR réalisée à partir de 10µL d'éluat ajouté dans 20µL de Master Mix.

## RESULTATS

Numéro échantillon					Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5			Type d'échantillon	Commentaires
	Résultat RT-PCR	Ct (E)	Ct (S)	Ct (IC)	Résultat	IP2	IP4		
10-3	Positif	22,4	21,4	30,0	Positif	22,9	22,4	sumageant de culture virale - dilution 10-3	
10-4	Positif	26,4	25,4	29,3	Positif	27,3	26,9	sumageant de culture virale - dilution 10-4	
10-5	Positif	29,3	28,0	28,9	Positif	29,7	29,4	sumageant de culture virale - dilution 10-5	
10-6	Positif	33,9	32,4	29,0	Positif	34,3	33,3	sumageant de culture virale - dilution 10-6	
10-7 (1)	Pos Lim	38,6	NEG	29,1	Positif	37,4	36,6	sumageant de culture virale - dilution 10-7 (1)	
10-7 (2)	Positif	37,6	36,5	30,5	Positif	37,8	36,9	sumageant de culture virale - dilution 10-7 (2)	
10-7 (3)	Positif	35,8	35,2	29,1	Positif	38,0	37,8	sumageant de culture virale - dilution 10-7 (3)	
10-8 (1)	Pos Lim	38,7	NEG	29,3	Négatif	NEG	NEG	sumageant de culture virale - dilution 10-8 (1)	
10-8 (2)	Négatif	NEG	NEG	29,0	Négatif	NEG	NEG	sumageant de culture virale - dilution 10-8 (2)	
10-8 (3)	Négatif	NEG	NEG	28,7	Négatif	NEG	NEG	sumageant de culture virale - dilution 10-8 (3)	
020058924501 206-70	Positif	22,4	20,5	31,2	Positif	22,7	23,1	aspiration trachéo-bronchique	signal de la courbe du IC non exponentiel
020059175401 210-53	Positif	25,2	24,2	31,4	Positif	25,5	26,2	aspiration trachéo-bronchique	signal de la courbe du IC d'intensité plus faible que les autres
020058953701 207-44	Positif	26,2	25,3	29,6	Positif	26,7	27,0	écouvillon naso-pharyngé	
020059167901 210-43	Positif	28,0	27,0	29,4	Positif	28,5	28,7	aspiration naso-pharyngée	
020058871001 205-71	Positif	33,2	31,4	29,2	Positif	30,9	32,2	aspiration trachéo-bronchique	courbe cible E de faible intensité courbe cible S de faible intensité
020059414601 212-23	Positif	34,9	33,4	29,3	Positif	33,1	34,7	écouvillon naso-pharyngé	courbe cible E de faible intensité courbe cible S de faible intensité
020058955201 207-47	Négatif	NEG	NEG	29,1	Positif	35,9	35,1	écouvillon naso-pharyngé	
020059182501 210-57	Pos Lim	37,3	NEG	29,7	Positif	36,1	35,5	écouvillon naso-pharyngé	courbe cible E de faible intensité
200517401 119-75	Négatif	NEG	NEG	29,4	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	Virus influenza A (Ct 19,4) Hologic
200511169 115-23	Négatif	NEG	NEG	29,1	Négatif	NEG	NEG	écouvillon naso-pharyngé	Virus influenza B (Ct 26,6) Hologic

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection

La technique de référence du CNR détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  sur les deux cibles ;
- pour les trois dilutions  $10^{-7}$ , sur les deux cibles avec une intensité de fluorescence plus faible ;
- pour les trois dilutions  $10^{-8}$  : aucune dilution n'a été détectée.

Conditions d'utilisation mentionnées ci-dessus : utilisation d'une technique d'extraction appropriée pour les prélèvements respiratoires.

Le test RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (REF 821003) RUO était valide pour les échantillons testés avec une détection du **contrôle interne (IC) correcte à l'exception des échantillons positifs les plus forts** (Ct de 23 et 26) pour lesquels la courbe du IC était d'intensité plus faible ou moins exponentielle.

- pour les dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  : détection des cibles E et S avec des Ct proches de ceux obtenus avec la technique du CNR ;
- pour les trois dilutions  $10^{-7}$  : détection des deux cibles dans deux cas et seulement de la cible E dans un cas,
- pour les trois dilutions  $10^{-8}$ , détection de la cible E dans un cas.

Pour les gammes de dilutions de virus, les résultats sont similaires avec ceux obtenus avec la technique IP2/IP4.

Pour les échantillons respiratoires testés, les résultats sont qualitativement similaires avec ceux obtenus avec la technique IP2/IP4. Cependant, les signaux de fluorescence sont faibles pour des prélèvements respiratoires détectés avec des  $Ct \geq 31$  avec la technique de référence CNR. Ces signaux ayant une intensité de fluorescence plus faible doivent donc être considérés comme positifs. **On note un possible défaut de détection des prélèvements ayant un  $Ct \geq 35$**  avec la technique de référence (1 prélèvement non détecté, 1 prélèvement détecté positif sur la cible E seulement).

Le test RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (REF 821003) RUO présente :

- une sensibilité similaire à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) pour les dilutions de virus testées ;
- une sensibilité légèrement inférieure à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon) avec un possible défaut de détection pour les prélèvements respiratoires faiblement positifs ( $Ct \geq 35$ ) ;
- il n'a pas été observé de réaction croisée avec d'autres virus respiratoires (sur 3 échantillons testés)

Le test est facile d'utilisation et la RT-PCR dure 130 minutes (sans compter le temps nécessaire à l'extraction).

## **CONCLUSIONS**

Le Centre National de Référence des Virus des Infections Respiratoires considère que le kit soumis peut être utilisé pour la détection du SARS-CoV-2 dans le cadre de l'épidémie de COVID-19 que connaît actuellement la France.