

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 27.03.2020

En complément d'un essai préliminaire du 17.03.2020 (sur ARN déjà extraits)

Nom du Kit : ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® (REF 423717) TEST RUO

Fournisseur : bioMérieux®

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)

Tel : 04 72 07 10 35

Correspondant



Martine Joannes
bioMérieux | VP Molecular Franchise

OBJECTIFS

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique et à 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
- Echantillons respiratoires de patients de différentes nature, positifs ou négatifs pour le SARS-CoV-2 (pour tester à minima l'effet matrice et la spécificité)
 - écouvillons naso-pharyngés (4 positifs, 3 négatifs)
 - aspiration naso-pharyngée (2 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)

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 : ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® (REF 423717) TEST RUO

Le test comprend la possibilité de réaliser deux RT-PCR triplex en parallèle ou au choix :

- un mix pour RT-PCR 1 détectant spécifiquement le SARS-CoV-2 (cibles dans le gène N et le gène RdRp) ainsi qu'un contrôle interne (IC1) et
- un mix pour RT-PCR 2 détectant de façon générique les virus SARS-like (SARS et SARS-CoV-2) (cible dans le gène E) ainsi qu'un contrôle cellulaire (Cell) et un contrôle interne (IC1)

Mise en œuvre :

- Extraction de 200µL de prélèvement respiratoire additionné de 10 µL de IC1 (*Internal Control*) sur EMAG
- RT-PCR réalisée à partir de 10µL d'éluat ajouté dans 15µL de chaque Mix (pour RT-PCR 1 spécifique d'une part et RT-PCR 2 générique d'autre part)

RESULTATS

| Numéro échantillon | ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® (REF 423717) TEST RUO | | | | | | | | Technique de référence PCR Institut Pasteur; Extraction Emag; Amplification QS5 | | | Type d'échantillon | Commentaires |
|--------------------|--|--------|-----------|----------|---------------------|--------|------------|----------|---|------|------|---|--|
| | Résultat RT-PCR (1) | Ct (N) | Ct (RdRp) | Ct (IC1) | Résultat RT-PCR (2) | Ct (E) | Ct (Cell)* | Ct (IC1) | Résultat | IP2 | IP4 | | |
| 10-2 | Positif | 25,2 | 24,7 | 23,7 | Positif | 25,5 | NEG | 23,3 | Positif | 24,2 | 24,6 | surageant de culture virale - dilution 10-2 | |
| 10-3 | Positif | 32,3 | 30,1 | 25,1 | Positif | 29,7 | NEG | 23,9 | Positif | 27,8 | 28,1 | surageant de culture virale - dilution 10-3 | |
| 10-4 | Positif | 32,0 | 30,9 | 24,1 | Positif | 33,3 | NEG | 24,2 | Positif | 31,3 | 31,1 | surageant de culture virale - dilution 10-4 | |
| 10-5 (1) | Pos Lim | 38,9 | 35,5 | 23,7 | Pos Lim | 38,7 | 42,5 | 24,2 | Positif | 35,0 | 34,6 | surageant de culture virale - dilution 10-5 (1) | signaux de fluorescence N et RdRp très bas |
| 10-5 (2) | Pos Lim | 38,4 | 40,3 | 24,0 | Négatif | NEG | NEG | 24,9 | Positif | 35,0 | 34,3 | surageant de culture virale - dilution 10-5 (2) | signaux de fluorescence N et RdRp très bas |
| 10-5 (3) | Pos Lim | 38,8 | 37,5 | 24,3 | Pos Lim | 37,3 | NEG | 24,7 | Positif | 34,8 | 35,0 | surageant de culture virale - dilution 10-5 (3) | signaux de fluorescence N et RdRp très bas |
| 10-6 (1) | Négatif | NEG | NEG | 24,0 | Négatif | NEG | NEG | 24,5 | Négatif | NEG | NEG | surageant de culture virale - dilution 10-6 (1) | |
| 10-6 (2) | Négatif | NEG | NEG | 24,0 | Pos Lim | 39,6 | NEG | 24,1 | Pos Lim | NEG | 39,0 | surageant de culture virale - dilution 10-6 (2) | |
| 10-6 (3) | Négatif | NEG | NEG | 23,8 | Négatif | NEG | NEG | 24,0 | Pos Lim | 39,7 | NEG | surageant de culture virale - dilution 10-6 (3) | |
| 10-7 (1) | Négatif | NEG | NEG | 24,0 | Négatif | NEG | NEG | 24,8 | Négatif | NEG | NEG | surageant de culture virale - dilution 10-7 (1) | |
| 10-7 (2) | Négatif | NEG | NEG | 23,4 | Négatif | NEG | 37,7 | 24,1 | Pos Lim | 42,1 | 39,5 | surageant de culture virale - dilution 10-7 (2) | |
| 10-7 (3) | Négatif | NEG | NEG | 32,2 | Négatif | NEG | NEG | 24,3 | Négatif | NEG | NEG | surageant de culture virale - dilution 10-7 (3) | Possible défaut d'extraction (Ct IC1 décalé) |
| 200487042 092-85 | Positif | 26,1 | 25,5 | 25,1 | Positif | 26,2 | 21,8 | 25,2 | Positif | 26,0 | 26,0 | aspiration naso-pharyngée | |
| 200508600 113-20 | Positif | 27,8 | 26,6 | 25,4 | Positif | 27,6 | 24,2 | 25,0 | Positif | 25,6 | 26,6 | écouvillon naso-pharyngé | |
| 200505516 111-72 | Positif | 29,0 | 28,2 | 25,0 | Positif | 29,4 | 25,0 | 25,0 | Positif | 27,9 | 28,3 | écouvillon naso-pharyngé | |
| 200504863 110-49 | Positif | 32,9 | 30,5 | 24,7 | Positif | 33,3 | 22,6 | 25,3 | Positif | 30,3 | 30,7 | écouvillon naso-pharyngé | |
| 200503469 108-75 | Positif | 34,7 | 32,8 | 24,8 | Positif | 36,6 | 22,9 | 26,0 | Positif | 33,3 | 33,5 | écouvillon naso-pharyngé | |
| 200401854 106-99 | Positif | 38,2 | 34,6 | 24,5 | Positif | 37,9 | 24,4 | 25,3 | Positif | 34,0 | 34,0 | aspiration naso-pharyngée | |
| 200517401 119-75 | Négatif | NEG | NEG | 26,0 | Négatif | NEG | 22,6 | 26,7 | Négatif | NEG | NEG | écouvillon naso-pharyngé | Virus influenza A (Ct 19,4) Hologic |
| 200528399 131-2 | Négatif | NEG | NEG | 23,5 | Négatif | NEG | 26,7 | 24,4 | Négatif | NEG | NEG | écouvillon naso-pharyngé | VRS (Ct 36,6) Hologic |
| 200511169 115-23 | Négatif | NEG | NEG | 24,7 | Négatif | NEG | 23,2 | 24,6 | Négatif | NEG | NEG | écouvillon naso-pharyngé | Virus influenza B (Ct 26,6) Hologic |

Abréviations : Pos Lim : Positif en limite de détection

Remarques : * il est normal de ne pas détecter le contrôle cellulaire dans les surageants de culture de virus qui contiennent des quantités infimes de cellules.

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

- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-4} sur les deux cibles ;
- pour les trois dilutions 10^{-5} sur les deux cibles ;
- pour les trois dilutions 10^{-6} , seules deux dilutions sont détectées ($Ct \geq 39$) avec l'une des cibles ;
- pour les trois dilutions 10^{-7} , seule une dilution est détectée avec les deux cibles ($Ct \geq 39$)

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

Le test ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® (REF 423717) TEST RUO était valide pour les échantillons testés avec une détection du contrôle interne correcte à l'exception de la dilution de surnageant de virus 10^{-7} (décalage du Ct du contrôle interne IC1 de 10 Ct suggérant un problème d'extraction ou de défaut de pipetage du dépôt de l'éluat). Le test détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

- pour les dilutions 10^{-2} à 10^{-4} (détection des cibles N et RdRp (RT-PCR1) et de la cible E (RT-PCR2) ; le Ct est proche des Ct obtenus avec la technique du CNR ;
- pour les trois dilutions 10^{-5} (Ct environ 35 avec technique CNR), on observe une détection mais en limite de détection pour les 2 cibles N et RdRp (RT-PCR1), et une détection en limite de détection de 2 dilutions pour la cible E (RT-PCR2)
- pour les trois dilutions 10^{-6} , seule une dilution est détectée en limite de détection sur la cible E.

Pour les échantillons testés, les résultats sont similaires avec ceux obtenus avec la technique IP2/IP4.

D'une façon générale, on note que les Ct obtenus pour la cible RdRp sont proches de ceux obtenus avec la technique de référence IP2/IP4. Les Ct obtenus pour les cibles dans les gènes N et E sont décalés par rapport au Ct en IP2/IP4 : le décalage est faible si $Ct < 30$ en IP2/IP4, le décalage peut être ≥ 3 Ct si $Ct > 35$ en IP2/IP4. La fluorescence de la sonde ciblant le gène N (fluorescence FAM) est cependant plus intense que pour les autres gènes.

Le test ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE® (REF 423717) TEST RUO présente :

- une sensibilité similaire à celle de la technique de référence CNR IPP (testée à Lyon). On note une baisse de sensibilité à partir des Ct de 35, rattrapée par la présence de plusieurs cibles qui permet d'avoir un résultat qualitatif similaire à celui de la technique de référence ;
- 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 116 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.